

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

## SUR LE TITRAGE DES ANTITOXINES ET DES TOXINES TÉTANIQUES PAR LA FLOCCULATION

par G. ABT et M<sup>lle</sup> B. ERBER.

(*Travail du Laboratoire du D<sup>r</sup> Louis Martin.*)

La flocculation des mélanges de toxine et d'antitoxine, découverte par G. Ramon, est le principe d'une méthode si commode pour le titrage des toxines et antitoxines diphtériques (1), que l'on a essayé, dans bien des laboratoires et Instituts sérothérapiques, de l'appliquer également au titrage des toxines et antitoxines tétaniques. On a obtenu la flocculation de mélanges neutres, mais pas avec la même régularité ou la même précision que dans le cas de la diphtérie (2); la méthode ne s'est pas imposée.

Nous avons essayé de l'adapter au titrage des sérums de chevaux en cours d'hyperimmunisation, dans une zone d'activité allant de 20 à 200 unités américaines. Nous n'avons pas réussi jusqu'à présent à la perfectionner dans le sens et au degré que nous désirions. Mais notre technique permettrait, croyons-nous, de titrer correctement environ 90 p. 100 des

(1) G. RAMON, Sur une technique de titrage *in vitro* du sérum antidiphtérique. *Société de Biologie*, 1<sup>er</sup> avril 1922, 86, p. 711. Dans cette note, Ramon a indiqué que le procédé était applicable au dosage de l'antitoxine tétanique.

(2) W. SCHOLZ. *Centralbl. f. Bakteriol.*, 92, p. 434, 1924.

sérums, résultat qui en justifierait déjà l'introduction dans la pratique.

Il est essentiel d'opérer aux environs de 45°, au bain-marie. Dans l'étuve à 36°-37°, la floculation est très lente et la zone de floculation s'étale alors sur plusieurs tubes; ou même on n'obtient pas de floculation. La température de 45° est préférable à celles de 50°, 55°, 60°, avec lesquelles la netteté des titrages diminue à mesure qu'on s'éloigne de l'optimum.

Nous prenons 4 cent. cubes d'une toxine, qui tue en moyenne la souris à 1/20.000 de centimètre cube, en trois à quatre jours. La quantité minima, pour avoir des floculations bien distinctes, est 3 cent. cubes. Avec 10 cent. cubes, les titres trouvés pour les sérums ont été, dans les expériences comparatives, les mêmes qu'avec 4 cent. cubes. Nous avons constaté que, avec un peu d'habitude, on lisait aussi facilement les résultats sur 4 cent. cubes que sur 10 cent. cubes. Il n'y a aucun avantage, au contraire, à diluer à l'eau physiologique ou distillée, ni à soumettre à la dialyse soit la toxine seule, soit le mélange toxine-antitoxine avant le chauffage.

Nous avons employé au cours d'une année dix préparations de toxine du service de Sérothérapie de l'Institut Pasteur; elles étaient sensiblement de la même force, à l'égard de l'animal, sauf deux un peu plus faibles que les autres. De même, pour toutes, 4 cent. cubes floculaient en deux à trois heures, à 45°, avec des quantités de 0 c. c. 16 à 0 c. c. 18 de notre sérum étalon. Les irrégularités observées dans les expériences de floculation avec d'autres sérums sont donc uniquement le fait des sérums et non celui des toxines.

Le sérum étalon était un sérum desséché, datant de deux ans et titrant 200 unités américaines. Une solution conservée en tube scellé, à la glacière, pouvait être utilisée pendant plusieurs mois; il fallait seulement prolonger, à mesure qu'elle vieillissait, le temps de séjour au bain-marie.

Pour titrer un sérum, on commence par titrer la toxine, en calculant le nombre d'unités antitoxiques contenu dans la quantité de sérum étalon qui est la première à floculer avec 4 cent. cubes de la toxine. Par exemple, pour 0 c. c. 16 d'un sérum à 200 unités, ce sera 32 unités. La toxine contiendra 32 unités toxiques dans 4 cent. cubes, c'est-à-dire 8 par cen-



timètre cube. Pour ce titrage, on peut faire une échelle de tubes contenant, pour 4 cent. cubes de toxine, des quantités de sérum étalon différant entre elles de 0 c. c. 01, et saisir le moment où un seul de ces tubes a floculé. La précision n'est pas plus grande lorsqu'on dilue le sérum au quart; on ne peut pas mettre entre deux tubes voisins une différence inférieure à 0,04, et les lectures ne sont pas plus faciles. Une fois la toxine titrée, il faut trouver la quantité du sérum à examiner qui est la première à flocler avec 4 cent. cubes de toxine : elle contiendra 32 unités antitoxiques; on en déduit le nombre d'unités par centimètre cube.

**Tableau type pour le titrage des sérums antitétaniques.**

A. Quantités de sérum pour 4 cent. cubes de toxine.

B. Unités antitoxiques, par cent. cube de sérum  
calculées pour une toxine à 8 unités par centimètre cube.

A . . . . .	2,0	1,75	1,50	1,25	1,10	1,0
B . . . . .	16	18	21	25	29	32
A . . . . .	0,89	0,81	0,73	0,67	0,61	0,55
B . . . . .	35	39	43	47	52	58
A . . . . .	0,50	0,45	0,40	0,35	0,32	0,29
B . . . . .	64	71	80	91	100	110
A . . . . .	0,25	0,24	0,22	0,20	0,18	0,16
B . . . . .	123	133	145	160	177	200

Au-dessus de 200 unités, diluer le sérum de moitié, puis des deux tiers, et employer l'échelle de 100 à 200 unités.

Mais pour avoir le titre d'un sérum avec une approximation d'environ 10 p. 100, il faut choisir une échelle de doses convenable (voir le tableau type ci-joint). Pour un sérum de 125 à 200 unités, la raison de la progression arithmétique sera 0,02 et les doses, *pour nos toxines*, 0,16 à 0,26. De 90 à 125 unités, la raison sera 0,03 et les doses 0,26 à 0,35. De 58 à 90 unités, raison : 0,05; doses : 0,35 à 0,55. De 43 à 58 unités, raison : 0,06; doses : 0,55 à 0,73. De 35 à 43 unités, raison : 0,08; doses : 0,73 à 0,89. De 29 à 35 unités, raison : 0,10; doses : 0,89 à 1,10. Enfin de 16 à 25 unités, 2 cent. cubes, 1 c. c. 75, 1 c. c. 50 et 1 c. c. 25. Pour les sérums très forts, il conviendrait sans doute de diluer, de moitié entre 200 et 400 unités, des deux tiers au-dessus de 400 unités; on pourrait alors se servir des mêmes séries qu'entre 100 et 200 unités. Ces chiffres n'ont aucun caractère impératif. Ils sont seulement choisis de

manière à satisfaire à deux conditions : 1° de deux tubes voisins, il est *généralement* possible de distinguer celui qui flocule le premier; 2° les titres correspondant à deux tubes voisins diffèrent environ de 10 p. 100, par exemple 160 et 177 unités, ou 64 et 71 unités.

La vitesse de floculation des sérums antitétaniques est très variable. N'ayant pas le loisir d'observer les tubes pendant toute la durée du séjour au bain-marie, nous avons dû nous borner à les examiner entre la deuxième et la quatrième heure, puis entre la septième et la huitième, puis après la vingtième; il ne nous a pas paru utile, après essai, de prolonger l'observation au-delà de cette dernière limite. Sur un groupe de 51 sérums, titrant de 25 à 200 unités, 18 avaient floculé en deux à quatre heures (35 p. 100), 23 entre sept et huit heures (45 p. 100), et 6 après vingt heures (12 p. 100); enfin 4 (8 p. 100) n'ont pas présenté de floculation bien nette, quelle que soit la durée du séjour au bain-marie. En général, les sérums les plus faibles sont ceux qui floculent le plus lentement. Mais il y a une vitesse de floculation propre à chaque sérum, indépendamment du titre, comme le montre le tableau suivant :

UNITÉS antitoxiques	TEMPS DE CHAUFFAGE A 45°			PAS floculés
	2 à 4 heures	7 à 8 heures	20 heures	
170 à 200. . . . .	2	—	—	—
140 à 170. . . . .	2	3	—	—
100 à 140. . . . .	5	—	1	—
50 à 100. . . . .	5	6	2	4
25 à 50. . . . .	4	14	3	—
Totaux . . . . .	18	23	6	4

La méthode n'est d'une précision parfaite que lorsqu'on peut saisir le moment où un seul tube a floculé. Sur un groupe de 34 sérums, nous avons obtenu ce résultat 21 fois (62 p. 100), avec des titres de 25 à 160 unités. Pour les autres sérums, il est possible que le moment critique se soit placé dans un des intervalles de nos observations; néanmoins, certains sérums ont manifestement une zone de floculation plus large que



d'autres. Sous la réserve que nous venons d'exprimer, nous avons noté, dans le même groupe de 34 sérums, 3 sérums pour lesquels les tubes extrêmes, floculés au moment de la lecture, correspondaient à des titres différant entre eux de moins de 10 p. 100; 2 pour lesquels l'écart était de 10 à 12 p. 100; 3 pour lesquels il était de 13 à 20 p. 100; 5 pour lesquels il était de 22 à 34 p. 100. Le cas le moins satisfaisant donnait pour les deux tubes extrêmes des titres respectifs de 70 et 94 unités (différence : 34 p. 100).

Y a-t-il concordance entre le titrage par flocculation et le titrage sur l'animal? Les titres obtenus par les deux méthodes sont toujours voisins l'un de l'autre. Mais nous ne pouvons pas dire pour le moment si l'accord est toujours rigoureux, ni de quel ordre de grandeur seraient les divergences. Cette question sera l'objet d'une nouvelle série d'expériences. Dans celle que nous rapportons, le dosage des sérums sur l'animal n'avait pas été fait avec assez de précision. D'abord, on ne peut fixer un titre précis, dans le cas des antitoxines tétaniques, qu'en prenant un chiffre moyen, établi sur un assez grand nombre d'animaux : les différences individuelles sont un facteur bien plus important que pour les antitoxines diphtériques. En outre, dans l'essai des sérums de chevaux en cours d'hyperimmunisation, on se contente, dans la pratique, de fixer des limites autour desquelles se placerait le titre exact. Ce sont ces déterminations approximatives que nous avons dû prendre comme termes de comparaison. Néanmoins, sur 38 sérums, 24 nous ont donné des titres qui se sont trouvés correspondre rigoureusement à ceux du titrage *in vivo* (60 p. 100). Parmi les 14 autres, 10 avaient à la flocculation un titre un peu plus élevé que celui qui avait été adopté après les essais sur la souris; mais la limite immédiatement supérieure, que ces sérums n'avaient pas atteinte, dépassait notablement le titre trouvé par la flocculation. La divergence peut donc, dans ces cas, être attribuée au manque de précision du titrage *in vivo*. Quant aux 4 autres sérums, les titres de la méthode de flocculation étaient inférieurs à ceux du dosage sur l'animal, respectivement de 16, 17, 18 et 30 p. 100. Dans ce dernier cas, une méthode donnait 60 unités et l'autre 46. Mais il est possible que le titrage sur l'animal aurait donné un chiffre plus voisin de celui du titrage

par floculation, si l'on avait établi une moyenne sur un plus grand nombre d'animaux. En tout cas, dans la pratique courante, il nous semble que le titrage par floculation atteindra toujours un degré de précision supérieur à celui du titrage sur l'animal.

Les flocons qui se rassemblent au fond des tubes paraissent moins volumineux que ceux qui se forment dans les mélanges de toxine et antitoxine diphtériques. Cependant les poids des floculats, séparés par centrifugation, lavés, séchés et pesés, sont presque les mêmes pour le même volume de nos toxines tétanique et diphtérique. Avec 400 cent. cubes de 3 toxines tétaniques, titrant respectivement 8, 9 et 9,5 unités toxiques par centimètre cube, nous avons recueilli 0 gr. 0195, 0 gr. 0199 et 0 gr. 0218 de floculat. Les sérums mélangés avec ces toxines étaient de titre très différent, 66, 138 et 110 unités par centimètre cube. La proportionnalité très satisfaisante entre les quantités de toxine vraie (mesurées par les unités toxiques) et les poids de floculat est en faveur de l'hypothèse que les éléments du milieu autres que la toxine et l'antitoxine pures ne participent pas à la réaction. D'autre part, 400 cent. cubes de toxine diphtérique, à 11,5 unités toxiques par centimètre cube, ont donné pour le mélange neutre un floculat pesant 0 gr. 019. Les poids sont donc de même ordre pour les deux toxines. Il est curieux que les titres des toxines courantes du service de sérothérapie, en unités toxiques, c'est-à-dire en quantités neutralisées par l'unité antitoxique d'Ehrlich (devenue unité internationale) pour la diphtérie et par l'unité américaine pour le tétanos, soient très voisins les uns des autres. Quant aux antitoxines, il faut à peu près, pour neutraliser 4 cent. cubes de nos toxines, deux fois plus de sérum antitétanique à 200 unités que de sérum antidiphtérique à 450-500 unités.

En résumé, le titrage des toxines et antitoxines tétaniques par floculation pourrait s'imposer dans la pratique aussi bien que celui des toxines et antitoxines diphtériques, si l'on obtenait une floculation parfaitement nette pour *tous* les sérums.

Nous avons constaté, une seule fois, deux zones de floculation, correspondant à des titres respectifs de 100 et 260 unités; le phénomène nous a été également signalé par d'autres expé-



rimentateurs. Nous ne pensons pas qu'il puisse créer de grandes difficultés dans la pratique.

Le problème qui reste à résoudre, c'est d'amener la floculation des sérums récalcitrants. Nous avons essayé de les titrer par différence. Dans une série de tubes, on ajoute à la toxine la moitié (au maximum) de la quantité de sérum étalon nécessaire pour la neutraliser exactement; puis on complète avec une échelle de doses du sérum à titrer. La méthode donne des résultats très exacts avec un sérum qui flocule déjà par lui-même. Elle n'a pas réussi avec deux échantillons qui ne floculaient pas.

Il semble que la floculation soit empêchée par la présence d'un élément du sérum, sans doute un colloïde protecteur, plus fréquent ou plus abondant dans les sérums antitétaniques que dans les sérums antidiphthériques. Il y a aussi des concentrations salines favorables ou défavorables; est-ce pour cette raison que les sérums concentrés (par la méthode au sulfate de soude) ne floculent pas? Nous avons cherché en vain à obtenir la floculation ou à la rendre plus apparente, en modifiant la tension superficielle du milieu, en ajoutant diverses substances, salines et autres. Ces essais n'ont pas donné des résultats assez caractéristiques pour qu'on puisse en faire état; mais nous n'abandonnons pas ces recherches.

\*  
\* \*

On peut actuellement, en attendant mieux, titrer par la floculation la grande majorité des sérums antitétaniques, et surtout des sérums forts. Comme le résultat est acquis en quelques heures, une vingtaine au plus, on pourrait toujours reprendre, pour le titrage sur l'animal, les quelques sérums qui ne floculeraient pas. Ce serait déjà une grande simplification, une économie d'animaux et de temps.

# ATTENUATION ET POUVOIR ANTIGÈNE DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE TRAITÉE PAR DIVERSES SUBSTANCES

par le Dr PAUL NÉLIS.

*(Laboratoire d'hygiène et de bactériologie  
de l'Université de Gand [1].)*

L'étude des agents et des substances qui exercent une influence sur la toxine diphtérique remonte aux expériences de Roux et Yersin. En 1889, ces auteurs [29], après avoir démontré l'existence de la toxine diphtérique et après l'avoir isolée, constataient déjà l'atténuation et la destruction qu'elle subit sous l'influence de la chaleur et de la lumière; ils étudiaient également l'action des acides sur la toxine et observaient une diminution de la toxicité, par addition d'acide tartrique ou d'acide lactique, qui réapparaissait en partie par neutralisation; ils démontraient également le rôle de l'iode sur la destruction de la toxine. En 1890, Behring [4] utilisait le trichlorure d'iode et les sels d'or pour atténuer la toxine. En 1892, Gamaleia [12] trouvait que la toxine se modifie sous l'influence de diastases telles que la pepsine et la trypsine. Plus tard, cette question fut reprise par Löwy (1920) [21].

Viennent alors les travaux de Doerr [8] en 1908 sur l'action des acides, de Russ et de Raubitchek [30] sur l'action des savons (1909), ceux de De Waele [7] (1909), de Calcaterra [4]

(1) Ce travail a été effectué pendant les années 1924-1926 sous la direction de mon cher maître le professeur Henseval que la mort vient d'enlever en pleine activité. Je réitère ici publiquement l'expression de ma profonde reconnaissance pour les conseils judicieux qu'il n'a cessé de me prodiguer au cours de mes recherches.



(1910), de Filia [11] (1911-1912) sur l'action de la lécithine et de la cholestérine.

En 1913, Marie [24] démontrait le rôle de l'adrénaline et des sels de quinine sur la toxine. Plus récemment, certains auteurs ont mis en lumière l'action des métaux et des sels métalliques. Le Fèvre de Arrie [19] (1919), notamment, établit que les métaux colloïdaux, le fer et le manganèse particulièrement, détruisent la toxine *in vitro*.

D'autre part, des expériences furent faites pour rechercher l'action du formol sur la toxine diphtérique. Déjà en 1909, Lœwenstein [20] avait montré que l'addition de formol à la toxine tétanique permettait d'obtenir un bon antigène. Il essaya ensuite d'appliquer cette méthode d'atténuation à d'autres toxines, spécialement à la toxine diphtérique. Il poursuivit ses recherches pendant plusieurs années avec Eisler [10] et Busson [3] sans arriver à des résultats utilisables en pratique (1). En 1921, Glenney et Sudmersen [45] reprirent la question. En 1923, Ramon [27] parvint, à l'aide du formol, à rendre la toxine diphtérique complètement atoxique tout en lui conservant un pouvoir immunisant très élevé.

Enfin Berthelot et Ramon [2] (1925) d'une part, Pico et Miravent [26] (1926) d'autre part, ont entrepris l'étude de nombreuses substances chimiques (acides, alcalis, alcools, éthers, aldéhydes, etc.) en vue de déterminer si elles sont susceptibles, comme le formol, de modifier la toxine.

C'est à l'étude de certains de ces corps : eau distillée, ozone, formol, oléate de soude, sels de quinine, que j'ai consacré ce travail. J'ai tâché d'en préciser les conditions d'action et les modifications que subit la toxine diphtérique à leur contact.

Le travail comporte deux parties :

La première a pour objet l'étude de l'atténuation de la toxine par ces substances. La seconde est consacrée à l'examen du pouvoir antigène de la toxine ainsi traitée.

(1) Rappelons qu'en 1907-1908, H. Vincent avait étudié l'action de la bile, des ferments digestifs, des savons de soude sur la toxine tétanique (*C. R. Société de Biologie*, 43, 1907, p. 695, et *Ces Annales*, 22, 1908, p. 345).

## CHAPITRE PREMIER

**Atténuation de la toxine diphtérique  
par l'eau distillée, l'ozone, le formol, l'oléate de soude  
et les sels de quinine.**

§ I. — ACTION DE L'EAU DISTILLÉE  
(DIALYSE DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE).

Ayant été amené, au cours de ce travail, à employer de la toxine dialysée, je crois opportun d'exposer d'abord certaines modifications que la toxine subit au cours de la dialyse et de montrer le rôle qu'exerce sur elle l'eau distillée.

La question de savoir si la toxine diphtérique est dialysable, et dans quelle proportion, a été longtemps controversée. Cela tient à ce qu'on a effectué les essais avec différents dialyseurs, depuis la baudruche, le parchemin, les gelées, jusqu'à la membrane de collodion. C'est au moyen de cette dernière, actuellement la plus employée, que j'ai effectué mes expériences : j'ai préparé des sacs formés de trois couches de collodion suivant la méthode préconisée par Malfitano.

Voici la composition du collodion : alcool absolu 600 grammes, éther sulfurique 400 grammes, coton nitré (1) 50 grammes.

L'opinion généralement admise aujourd'hui est que la toxine diphtérique dialyse très lentement.

J'ai repris la question en opérant de la façon suivante : 100 cent. cubes de toxine diphtérique active à 1/700 sont soumis à la dialyse pendant quatre jours. Son pouvoir toxique qui diminue graduellement est déterminé chaque jour : après vingt-quatre heures, la dose minima mortelle est de 1/600 ; après quarante-huit heures, de 1/450 ; après trois jours elle tombe à 1/350 et atteint 1/300 environ à la fin du quatrième jour.

Cette diminution du pouvoir toxique se produit aussi bien dans les toxines vieilles que dans les toxines fraîches.

Est-elle due uniquement ou non à la dialyse du pouvoir toxique ?

(1) La même provision de coton nitré a servi pour toutes les expériences.



Pour élucider ce premier point j'ai procédé comme suit : je plonge un sac de collodion renfermant 100 cent. cubes de la toxine utilisée précédemment dans un vase contenant 300 cent. cubes d'eau distillée ; six heures après, je prélève une certaine quantité du liquide extérieur dont j'injecte 10 et 20 cent. cubes sous la peau de deux cobayes ; puis je renouvelle l'eau et, de six en six heures, je recommence mes opérations jusqu'à obtenir vingt-quatre heures de dialyse. Les huit animaux supportent parfaitement bien l'injection et ne présentent pas de réaction locale.

Si la perte de toxicité constatée dans la première expérience de dialyse était due *uniquement* au passage de la toxine à travers le dialyseur, la quantité injectée aux animaux serait bien suffisante pour les tuer. Il est à remarquer toutefois que, si on fait à un lapin une injection intradermique de 0 c. c. 2 de chacun des échantillons prélevés, on décele dans les vingt-quatre heures une faible réaction cutanée disparaissant le second jour et sensiblement analogue à celle qu'on obtient sur ces animaux au moyen d'une injection de 0,2 cent. cubes d'une toxine active à 1/100, diluée au 1/50.000.

Il y a donc une très petite quantité de toxine qui dialyse, mais cela n'explique pas entièrement la diminution de toxicité constatée plus haut. Il est à noter, en effet, que la perte de toxicité constatée durant la dialyse se poursuit ultérieurement. Ainsi, après un jour à la température du laboratoire (à partir du quatrième jour de dialyse), la toxine tue à 1/300 ; après six jours, elle ne tue plus qu'à 1/50 ; après dix jours, elle tue à 1/10, mais pas à 1/25. En dix jours l'activité est donc tombée de 1/300 à 1/10. La diminution de la toxicité de 1/700 à 1/300, constatée au cours de la dialyse, est donc probablement due en grande partie à l'auto-destruction de la toxine.

A ce moment (dixième jour), l'atténuation s'arrête. En effet, éprouvée sur le cobaye après quinze jours, un ou deux mois, elle tue encore à la dilution de 0 c. c. 1. Portée à ce moment à l'étuve à 37°, son pouvoir toxique ne s'est pas modifié même après deux mois.

A côté de cette diminution du pouvoir toxique, la dialyse fait subir à la toxine d'autres modifications : elle la débarrasse notamment des 9/10 des substances dialysables qui l'accom-

pagent, y compris les matières colorantes qui se fixent en partie sur la membrane de collodion, et des sels qu'elle renferme, ce qui modifie le sens de la réaction qui d'alcaline devient neutre.

Il se dégage de ces expériences deux faits importants :

1° La toxine diphtérique dialyse peu et lentement à travers les membranes de collodion;

2° Débarrassée des substances dialysables qui l'accompagnent, la toxine diphtérique perd *rapidement* une grande partie de son pouvoir toxique. Toutefois l'atténuation *complète* ne s'obtient qu'après un séjour prolongé à l'étuve.

## § II. — ACTION DE L'OZONE SUR LA TOXINE DIPHTÉRIQUE.

Dans un travail antérieur, de Potter [6] a montré que la toxine diphtérique résiste beaucoup plus qu'on ne le croyait aux divers agents oxydants : l'air, l'eau oxygénée, l'ozone, le permanganate de potasse.

L'ozone, qui n'introduit pas de substances étrangères dans le milieu, méritait d'être étudié d'une manière plus approfondie.

Je me suis servi de l'appareil de Siemens et Halske, qui comprend : un moteur alternatif actionné par une source de courant continu constant; un transformateur pouvant porter le courant alternatif de 110 à 8.000 volts; une batterie de quatre ozonateurs du type Berthelot-Siemens; une pompe à air, actionnée par le moteur précité, débitant une quantité d'air mesurée par un compteur à gaz et desséché sur du chlorure de calcium. Au sortir des ozonateurs, l'air ozonisé barbote à travers un flacon de toxine et l'excès de  $O_3$  est absorbé par une solution neutre d'iodure de potassium dont on titre l'iode mis en liberté ou transformé en iodate. J'ai employé pour ce dosage la méthode de Marmier, qui consiste à titrer d'abord l'iode libre en solution neutre, puis l'iode de l'iodate décomposé par acidification. Parmi les procédés divers essayés, c'est le seul qui m'ait donné des résultats constants (1).

(1) Si, en effet, on titre l'iode libre sans acidifier, les résultats sont inconstants et non proportionnels; si on acidifie avant le premier dosage, on dose plus d'iode qu'il n'en existe de libre.



L'appareil dont il s'agit produisait une quantité d'ozone pouvant varier, suivant le réglage, entre 0 gr. 551 et 0 gr. 983 d'O<sub>3</sub> par heure. Quand on soumet à un courant d'air ozonisé de 106 litres à l'heure, avec une teneur en O<sub>3</sub> de 0 gr. 0052 par litre, 250 cent. cubes de toxine diphtérique active à 1/500<sup>e</sup> et préparée depuis un mois, elle jaunit rapidement, puis elle brunit; après une demi-heure, l'intensité de la coloration s'atténue pour disparaître après trois heures environ. A ce moment, le liquide est devenu incolore, ne présentant ni trouble, ni dépôt. Sous l'effet de ce traitement, la substance spécifique se détruit progressivement. Après une heure et demie elle tue encore à la dose de 1 cent. cube, mais pas à 0 c.c. 5. Après deux heures et deux heures et demie, les cobayes supportent 2 à 4 cent. cubes, mais présentent des eschares au point d'injection; il faut trois heures d'oxydation pour pouvoir injecter aux cobayes, sans lésion locale, 5 cent. cubes de la toxine. La toxine ozonisée qui, primitivement, était alcaline ( $pH=8,6$ ) est devenue *franchement acide*; son acidité est égale à  $pH=1,9$  environ, ce qui correspond à 0 gr. 456 d'HCL par litre. Cette modification peut s'expliquer par la formation de nouvelles fonctions acides, sous l'effet de l'oxydation, aux dépens des peptones et des albumoses ou de leurs produits de dédoublement primaire. La toxine est loin d'absorber tout l'ozone qui la traverse: dans l'expérience précitée, elle a absorbé pendant les deux premières demi-heures 0 gr. 173 + 0 gr. 138 = 0 gr. 311 et pendant chacune des quatre demi-heures suivantes 0 gr. 0628 à 0 gr. 0392. L'inactivation complète de la toxine a demandé 0 gr. 525 de O<sub>3</sub>, soit 0 gr. 0021 par centimètre cube, ce qui représente une quantité énorme.

Les transformations qui ont été énumérées ne sont pas, à part la diminution de la toxicité, propres à la toxine; ainsi une toxine inactivée par chauffage à 80° se comporte de la même façon. Le bouillon Martin lui-même, subit ces modifications sous l'influence de l'ozone et la quantité de O<sub>3</sub> qu'il absorbe est sensiblement la même que celle qui est nécessaire à la destruction de la toxine.

Mais quelle est l'action intime de l'ozone sur la toxine diphtérique? Étant donné qu'elle renferme du NaCl, on peut se demander s'il n'y a pas formation d'hypochlorites, comme

Marmier [25] l'a observé, par l'action du courant continu (électrolyse); ces derniers agiraient alors directement sur la toxine. De plus, comme je supposais que l'ozone se fixe également sur des substances étrangères à la toxine, il était intéressant de l'en débarrasser dans la mesure du possible.

Aussi la toxine fut-elle dialysée pendant trente-six heures en employant de l'eau bidistillée; active à 1/500<sup>e</sup>, elle l'était encore à 1/400 après dialyse. Privée ainsi des 9/10 des matières organiques qui l'accompagnent, exempte de toute trace de chlorures, elle fut soumise ensuite à un courant d'air ozonisé de 92 litres à l'heure, avec une teneur de 0 gr. 008 d'ozone par litre. Après une demi-heure, elle était complètement inactivée, ayant absorbé 0 gr. 0005 d'O<sub>3</sub> par centimètre cube. Après trois heures d'oxydation elle était franchement acide ( $pH = 1,8$  environ, ce qui correspond à 0,793 HCL par litre).

On peut donc dire que l'ozone exerce une action directe sur la toxine elle-même ou, tout au moins, sur les albumoses qui servent de support à son principe spécifique. Cette action est plus intense sur la toxine dialysée, d'abord parce que son principe actif, débarrassé des substances qui l'accompagnent, est plus sensible, ensuite parce que l'ozone peut agir plus directement sur lui.

Je me suis demandé également si l'ozone ne modifiait pas la toxine diphtérique en lui conférant la propriété de neutraliser la toxine fraîche. On sait en effet que certains auteurs, notamment Smirnow [31], ont signalé que le courant continu pouvait provoquer l'apparition d'antitoxine dans la toxine. Cette affirmation a d'ailleurs été contestée par Marmier [25] à l'aide d'arguments solides. Je décidai toutefois de faire quelques essais.

J'ai constaté que l'addition de 1 cent. cube de toxine oxydée à une dose L + de toxine, élève celle-ci de 0,17 au delà de 0,25. De plus, si on met seules en présence la toxine oxydée et la toxine fraîche, on constate que 3 cent. cubes de toxine oxydée peuvent neutraliser 0 c. c. 17 de toxine fraîche.

Ce pouvoir de neutralisation paraît résulter de la présence de fonctions acides dans le milieu. Car si on injecte à des cobayes une partie du mélange dans la circulation, les animaux meurent d'intoxication diphtérique; il en est de même si on



fait l'injection sous la peau de ces mêmes mélanges *neutralisés*, ce qui montre que la toxicité est simplement masquée. La dialyse enlève également ce pouvoir de neutralisation par disparition des acides. J'ajouterai que le bouillon Martin, soumis à l'oxydation, acquiert cette propriété puisqu'il devient acide et la perd par neutralisation et dialyse. Quant à l'origine de ces acides, il semble qu'elle est due à la désintégration de la matière organique (acides aminés) aux dépens des substances non dialysables, puisque la toxine dialysée puis oxydée par l'ozone acquiert également une forte acidité.

### § III. — ACTION DU FORMOL SUR LA TOXINE DIPHTÉRIQUE.

Le mode d'action de l'aldéhyde formique dans la transformation de la toxine en anatoxine est encore, à l'heure actuelle, peu connu. On sait qu'on obtient ce produit en additionnant une toxine active d'une certaine quantité de formol (3,5 p. 1.000 de la solution commerciale) et en la laissant pendant un mois environ, à l'étuve à 37°. Après ce temps son pouvoir toxique a complètement disparu. Un fait a d'abord attiré mon attention, c'est la présence constante dans toutes les anatoxines d'aldéhyde formique qu'on peut déceler par les réactions spécifiques aux aldéhydes. Ces réactions disparaissent dans l'anatoxine dialysée, l'aldéhyde formique ayant été partiellement fixée par la membrane de collodion et partiellement éliminée par échange osmotique.

D'autre part, il est à présumer qu'une quantité importante de cette substance se combine avec les acides aminés se trouvant en grande quantité dans le milieu de culture. Je me suis efforcé d'établir la quantité de formaldéhyde qui se fixe : a) sur la toxine et sur le bouillon Martin avec lequel la toxine a été obtenue; b) sur l'anatoxine telle quelle; c) sur la toxine dialysée, exempte d'acides aminés, de peptones et autres substances dialysables. Pour cela, j'ai ajouté à 250 cent. cubes de chacun de ces produits 3,5 p. 1.000 de formol dont j'ai dosé, après contact d'une heure, le formol resté libre; les résultats obtenus sont consignés dans le tableau I.

TABLEAU I. — Indiquant le pourcentage de formol fixé dans les produits ci dessous.

NUMÉRO des bouillons	POURCENTAGE de formol fixé	NUMÉRO des toxines	POURCENTAGE de formol fixé	NUMÉRO des anatoxines	POURCENTAGE de formol fixé	NUMÉRO des toxines dialysées	POURCENTAGE de formol fixé
V	p. 1.000 2	V	p. 1.000 2,6	V	p. 1.000 2,9	V	p. 1.000 0,4
II	1,9	X	2,4	III	2,9		
I	2,2	XI	2,7	VII	3,1	XI	0,6
		VII	2,1				

Après contact d'une heure (sauf pour l'anatoxine), je sou mets le produit à la distillation après l'avoir au préalable neutralisé ; je recueille le distillat dans lequel je dose l'aldéhyde formique libre par la méthode iodométrique (1).

La comparaison des chiffres obtenus montre :

1° que la toxine fixe rapidement une grande partie de l'aldéhyde formique environ 70 p. 100 ; le bouillon dont elle dérive en fixe un peu moins, 57 p. 100 environ ;

2° que la fixation de la formaldéhyde est plus considérable encore dans l'anatoxine où elle atteint 90 p. 100 : elle contient donc 10 p. 100 de formol libre ;

3° que la majeure partie de l'aldéhyde formique s'unit aux substances dialysables (surtout acides aminés) et une petite partie aux substances non dialysables (surtout albumoses et principe spécifique).

Je ne suis pas parvenu, à l'heure actuelle, à déterminer si l'aldéhyde formique *libre* joue un rôle dans la formation de l'anatoxine ; en effet, si on ajoute à la toxine XI, par exemple, la quantité de formol qu'elle fixe après une heure, soit 2,7 p. 1.000, et si on la porte à l'étuve à 37° pendant un mois, on constate, qu'après ce temps, elle est devenue atoxique au point qu'on peut en injecter 5 cent. cubes sous la peau d'un cobaye comme avec l'anatoxine à 3,5 p. 1.000. Bien plus, si on recherche la présence du formol libre, on constate que la réaction qualita-

(1) Cette méthode est très exacte et préférable aux méthodes d'oxydation directe (méthodes à l'eau oxygénée, au bisulfite, etc...) dont les résultats ne sont pas proportionnels par suite d'une action souvent irrégulière de l'oxydant.



tive est fortement positive et, par le dosage, on retrouve environ 40 p. 100 de la quantité ajoutée.

J'ai voulu me rendre compte de la manière dont le formol agissait sur la *toxine dialysée* et quelle était la quantité de formol nécessaire pour l'inactiver.

J'ai, à cet effet, dialysé pendant quarante-huit heures une toxine active à 1/600. Après dialyse, son activité est de 1/400. Répartie en 3 flacons, auxquels j'ajoute respectivement 1,2 et 3,5 p. 1.000 de formol, je la porte à l'étuve à 37° et note la perte progressive de toxicité.

La toxine formolée à 3,5 p. 1.000 (n° 1) est déjà détruite après neuf jours, celle du flacon à 2 p. 1.000 (n° 2) l'est après douze jours, mais il faut un mois environ pour détruire la toxine à 1 p. 1.000 (n° 3).

Cette expérience montre que l'addition d'une petite quantité de formol à la toxine dialysée (1 p. 1.000) suffit pour lui enlever son pouvoir toxique dans le même délai que dans la toxine ordinaire. La toxine dialysée se trouve être plus sensible au formol. Cela résulterait de ce qu'une partie du formol, se fixant sur certaines substances contenues dans la toxine brute, ne peut plus agir sur elle.

De plus, si on recherche la présence de formol dans la toxine n° 1, après un mois d'étuve à 37°, on en trouve 1 p. 1.000 de fixé sur les 3 1/2 p. 1.000. Il en résulte donc que les 2,5 p. 1.000 en excès jouent un rôle dans l'atténuation de la toxine. Si on effectue la même recherche dans la toxine n° 3, on retrouve une grande partie de formol libre alors qu'on s'attendait plutôt à n'en pas déceler. Ce résultat, analogue à celui que j'ai signalé plus haut, montre combien sont obscurs les mécanismes de combinaison dans les milieux aussi complexes qu'est la toxine diphtérique.

Dernièrement, C. E. Picot et Miravent [26] ont signalé que le formol exerçait, *in vivo*, une action antitoxique sur la toxine diphtérique. Ils parviendraient à conserver en vie des cobayes ayant reçu un mélange extemporané de toxine (1 dose mortelle maximum) et de formol. De mon côté, j'ai repris l'expérience. S'il est vrai que l'addition d'une petite quantité de formol *injectée sous la peau*, atténue dans une légère mesure la toxine *in vivo*, il est impossible d'obtenir aucune atténuation de la

toxine quand on injecte ces mêmes mélanges extemporanés dans la circulation ; mais si on prolonge plus ou moins le temps de contact on parvient à injecter plusieurs doses mortelles par injection sous-cutanée et par injection intraveineuse.

#### § IV. — ACTION DE L'OLÉATE DE SOUDE SUR LA TOXINE DIPHTÉRIQUE.

En 1909, Raubitschek et Russ [30] ont étudié l'action de l'oléate de soude sur certaines toxines microbiennes, sur la ricine, l'arachnolysine, etc..., et ils ont signalé que cette substance était capable d'en détruire de grandes quantités, mais que son action était annihilée par le sérum normal, par les albumoses et par la gélatine ; aussi, ces auteurs ont-ils jugé nécessaire d'effectuer toutes leurs expériences sur des toxines précipitées par le sulfate d'ammoniaque. Ces faits présentent un haut intérêt pour la comparaison de l'action de l'oléate de soude sur la toxine avec celle de l'antitoxine ; leurs recherches étant assez sommaires, je décidai de reprendre l'étude de la question.

1° CONDITIONS D'ACTION DE L'OLÉATE DE SOUDE. — A dix flacons contenant 100 cent. cubes de toxine diphtérique stabilisée (D. M. M. 1/300), utilisée sans précipitation, j'ajoute respectivement 1, 2, 3, 4, etc..., 6, 7... 10 cent. cubes d'une solution d'oléate de soude à 1/100 ; je porte ces mélanges à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures et j'injecte 1 cent. cube de chacun à des cobayes de 250 à 280 grammes. Les deux premiers mélanges (100 + 1 et 100 + 2) restent nettement toxiques et tuent les animaux en vingt-quatre heures. Le troisième mélange tue les cobayes le quatrième jour ; le quatrième mélange et les suivants sont atoxiques en injections sous-cutanée et intraveineuse.

Ces résultats montrent le pouvoir antitoxique considérable de l'oléate de soude dont 4 centigrammes suffisent à détruire 30.000 doses mortelles de toxine, même en présence des peptones et des albumoses qu'elle renferme.

Notons que l'addition à de la toxine diphtérique préparée à l'aide du bouillon Martin, de 1 à 10 cent. cubes d'oléate de



soude à 1 p. 100 détermine dans les flacons 1, 2 et 3 une légère opalescence qui persiste sans donner de dépôt; dans les autres, une opalescence progressivement plus intense et qui donne lieu, après quelques jours, à un dépôt assez abondant. Mais, comme on obtient la même chose avec le bouillon Martin, ce phénomène n'est pas spécial à celle-ci.

La durée du contact ne modifie pas sensiblement l'activité de l'oléate de soude. Ainsi, après six mois, dont un passé à l'étuve, les flacons renfermant les mélanges 100 + 1 et 100 + 2 étaient restés aussi toxiques qu'au premier jour.

A la température ordinaire, l'effet est moins prononcé: l'oléate ne détruit qu'une petite quantité de toxine: 0 c.c. 5 pour 1 cent. cube d'oléate à 1 p. 100, après vingt-quatre heures. Toutefois, son action se continue les jours suivants; ainsi, après quatre jours de contact, la même quantité d'oléate peut neutraliser 10 cent. cubes de toxine.

Dans un mélange neutre de toxine + oléate, l'action de l'oléate est épuisée: c'est ainsi qu'il suffit d'ajouter 2 d. m. à 1 cent. cube du mélange 100 + 4 pour qu'il redevienne toxique pour le cobaye.

Enfin l'oléate de soude agit, pour une même toxine, en quantité rigoureusement proportionnelle; si on réduit de 10 à 1 la quantité d'oléate dans ce mélange, la quantité de toxine détruite est réduite exactement dans les mêmes proportions.

Malgré le peu de probabilité qu'il y avait de voir l'oléate exercer, *in vivo*, une action préventive vis-à-vis de la toxine diphtérique, puisque c'est une substance qu'on peut trouver normalement dans le sang, j'ai tenu néanmoins à en faire l'essai. Je n'ai pu injecter, sans troubles dans la circulation générale, une quantité supérieure à 2 cent. cubes de solution d'oléate à 1 p. 100, et dans la cavité péritonéale 5 cent. cubes à 2 p. 100. Avec ces quantités, on ne parvient pas à préserver de la mort les cobayes à qui on injecte, en même temps, une seule dose mortelle de toxine, ni à obtenir une réaction de Schick négative avec 1/50 de dose mortelle.

LA TOXINE TRAITÉE PAR L'OLÉATE DE SOUDE EST-ELLE DÉFINITIVEMENT DÉTRUITE OU PEUT-ELLE ÊTRE RÉGÉNÉRÉE? — Cette question pré-

sente un grand intérêt pour se rendre compte de la nature de l'action de l'oléate sur la toxine; d'autre part, elle est facile à élucider, car on peut décomposer l'oléate par l'addition, aux mélanges oléatés, d'une petite quantité d'acide chlorhydrique inoffensive pour les animaux, en injection intraveineuse. Si la toxine n'est pas définitivement détruite, on pourra la libérer ainsi en décomposant l'oléate avec lequel elle formerait, dans ce cas, un composé d'adsorption. Quant à l'acide oléique qui se forme, on ne peut guère supposer qu'il puisse jouer un rôle dans ce phénomène; d'ailleurs, Raubitschek et Russ eux-mêmes l'ont trouvé sans action sur la toxine diphtérique.

Comme de Potter [6] a établi que le lapin et le cobaye se comportent différemment dans les essais de dissociation des mélanges toxine-antitoxine, j'ai employé concurremment ces deux espèces animales. A deux portions de 18 cent. cubes des mélanges  $100 + 4$  et  $100 + 6$ , j'ai ajouté une quantité de HCl/N suffisante pour obtenir une réaction franchement acide, soit 9 cent. cubes, et je les ai laissés en contact pendant vingt-quatre heures à l'éluve à  $37^{\circ}$ ; puis je les ai injectés dans la circulation veineuse, à 3 cobayes et à 3 lapins, et sous la peau à 3 cobayes. Tous ces animaux ont survécu et les cobayes qui ont reçu les mélanges sous la peau n'ont pas présenté d'eschares. D'autre part, je recueille le dépôt obtenu par centrifugation dans le mélange  $100 + 4$  et je l'additionne d'HCl/N jusqu'à dissolution; le liquide est alors divisé en 2 parties qui sont injectées dans la circulation veineuse, à un lapin et un cobaye : ces deux animaux ont survécu sans présenter de manifestations pathologiques.

La toxine additionnée d'oléate de soude semble donc bien détruite; en tous cas elle ne peut être régénérée comme cela se produit dans le complexe toxine-antitoxine sous l'influence de l'HCl.

Raubitschek et Russ ont tenté d'expliquer l'action de l'oléate de soude sur la toxine diphtérique par l'intervention de petites quantités d'acides gras provenant de sa dissociation en solution aqueuse et par des phénomènes d'adsorption entre les micelles colloïdaux de savon et de toxine, mais ils n'ont pu, malgré leurs efforts, étayer leur manière de voir sur les données expérimentales. Ces hypothèses ne s'accordent pas avec les faits. En effet,

Mac Bain [23] a démontré que, dans les solutions très diluées, les savons se trouvent à l'état de solution parfaite.

D'autre part, Larson et Nelson [48] ont signalé récemment qu'on peut détruire la toxine diphtérique en abaissant la tension superficielle à 40 dynes par addition de savon d'huile de ricin; toutefois ils déclarent ensuite qu'ils ne peuvent déterminer pour le moment si l'effet du savon sur les toxines bactériennes est dû totalement, ou en partie, à l'abaissement de cette tension ou à d'autres propriétés. Je ne pense pas qu'on puisse attribuer l'action de l'oléate de soude ou de tout autre savon à l'abaissement de la tension superficielle. En effet, j'ai constaté qu'on ne détruit pas la toxine diphtérique en abaissant sa tension à la même quantité (40 dynes) par addition de certaines autres substances telles que l'éther ou le chloroforme.

#### § V. — ACTION DE LA QUININE SUR LA TOXINE DIPHTÉRIQUE.

Parmi les substances qui exercent une influence sur la toxine diphtérique se range la quinine. Marie a montré qu'elle était capable de détruire des quantités importantes de toxine tétanique (5 à 6 doses mortelles pour 1 milligramme de chlorhydrate de quinine). Mais, à ma connaissance, on n'a pas examiné son action sur la toxine diphtérique. Il m'a paru utile d'étudier d'une manière approfondie l'action de quelques-uns de ses sels en procédant comme je l'ai fait pour l'oléate de soude.

1° ACTIVITÉ ANTITOXIQUE. — Elle ressort des expériences suivantes : quand on ajoute 1 cent. cube d'une solution de bichlorhydrate de quinine à 1 p. 100, à des quantités croissantes de toxine diphtérique stabilisée, active à 1/100, par exemple 0,25; 0,37; 0,50; 0,62; 0,75 cent. cubes, et que, après *une heure* de contact, on injecte ces mélanges sous la peau à des cobayes de 250 grammes, on constate que 1 centigramme de bichlorhydrate de quinine est capable de neutraliser 50 d. m. de toxine. On observe cependant encore après cinq à huit jours des eschares avec tous ces mélanges.

Si on porte la durée de contact à vingt-quatre heures, on ne constate aucun changement; par contre, si on porte les mêmes mélanges à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures, on



constate une légère augmentation de l'atténuation de la toxine. L'atténuation de la toxine sous l'influence de la quinine après injection sous-cutanée n'est pas due à une action locale; en effet on peut injecter les mêmes mélanges dans la cavité péritonéale sans tuer les animaux. Par contre ceux-ci sont plus sensibles à l'injection intraveineuse. Ils supportent toutefois un mélange renfermant 0 c. c. 25 d'une toxine active à  $1/100 + 1$  centigramme de quinine, après une heure de contact, et on peut élever la dose à 0 c. c. 50 de toxine si le mélange est porté vingt-quatre heures à  $37^{\circ}$ . Quoi qu'il en soit, on peut dire qu'il ne s'agit pas ici de toxicité masquée.

J'ai recherché si tous les sels de quinine présentent une propriété analogue et quel était leur degré d'action.

Le bisulfate m'a donné des résultats identiques à ceux du bichlorhydrate. Il n'en est pas de même du monochlorhydrate, sel moins soluble dans l'eau que les précédents. Son action est beaucoup moins nette et 1 centigramme ne détruit que 5 d. m. environ. Le monosulfate presque insoluble ne peut être employé.

Il semble que la *présence* de la quinine dans les mélanges ne suffise pas pour obtenir l'atténuation de la toxine; il faut que le sel soit en solution; ainsi, quand le mélange est alcalin au point de précipiter une partie du sel de quinine, on peut diminuer sa toxicité en ajoutant une petite quantité d'HCl qui redissout une partie de la quinine, sans que la quantité d'acide ajoutée soit capable de jouer un rôle par elle-même.

Ajoutons que dans les mélanges toxine-quinine, surtout quand ils sont laissés à l'étuve, il se produit un précipité floconneux, à peu près analogue à celui que l'on observe dans les mélanges toxine-oléate.

La quinine n'agit pas sur la toxine diphtérique en quantité proportionnelle à la toxicité; ainsi 1 centigramme de bichlorhydrate de quinine détruit 0 c. c. 52 d'une toxine active à  $1/100$ ; 0 c. c. 45 d'une toxine active à  $1/250$  et 0 c. c. 45 d'une toxine active à  $1/600$ .

La quinine exerce-t-elle, *in vivo*, une action préventive, curative ou désintoxicante sur l'intoxication diphtérique?

L'étude du problème, très importante, ne peut malheureusement pas se faire dans des conditions très favorables chez le

cobaye. Cet animal ne supporte pas une dose élevée de quinine, tout au plus 1 centigramme de bichlorhydrate pour un cobaye de 250 grammes, quantité qui se trouve encore dissoute dans 16 cent. cubes de sang environ.

Parmi les essais nombreux et variés que j'ai effectués en employant diverses voies d'introduction de la toxine et de la quinine, j'en relaterai les plus favorables :

Injection sous-cutanée de une dose mortelle de toxine à 6 cobayes, suivie immédiatement de l'injection *sous-cutanée* de 1 centigramme de quinine; 2 animaux survivent plus de quinze jours. Les 4 autres meurent entre le sixième et le neuvième jour.

Injection sous-cutanée de une dose mortelle de toxine à 6 cobayes, suivie immédiatement de l'injection *intraveineuse* de 1 centigramme de quinine; 4 animaux ont survécu, les 2 autres sont morts après vingt-quatre heures.

La quinine paraît donc posséder une très légère action préventive vis-à-vis de la toxine diphtérique, mais son action curative est tout à fait nulle.

DÉNATURATION DE LA TOXINE DANS LE MÉLANGE TOXINE-QUININE. — La toxine est-elle définitivement détruite dans les mélanges inactivés ou peut-elle être régénérée?

Des essais préliminaires m'ont montré qu'on pouvait entièrement précipiter la quinine dissoute dans la toxine, en alcalinisant le milieu à suffisance et obtenir, par centrifugation, un liquide privé de l'alcaloïde. Cette technique m'a permis d'effectuer de nombreuses expériences de dissociation sans jamais parvenir à retrouver la toxine en employant, comme pour l'oléate, diverses voies d'introduction et différentes espèces animales.

On peut en déduire que la toxine est véritablement dénaturée.

### Considérations générales.

Si on examine l'ensemble des résultats obtenus dans ce premier chapitre, on remarque que la résistance de la toxine diphtérique à l'action de ces agents est assez variable et dépend

de divers facteurs dont les principaux sont : la concentration de la substance, la durée du temps de contact et la température.

Ainsi leur action vis-à-vis de la toxine est proportionnelle à leur concentration et cesse quand la substance est épuisée. La durée de contact, importante pour l'action de l'oléate et du formol, l'est moins pour la quinine. Quant à l'intervention de la température, elle est surtout manifeste dans l'atténuation de la toxine par l'aldéhyde formique et plus encore par l'oléate de soude. Elle paraît agir dans ces deux cas, comme une sorte de catalyseur; par exemple, la proportion de toxine atténuée par une même quantité d'oléate varie dans le rapport de 1 à 200 suivant que les mélanges sont maintenus à la température du laboratoire ou à celle de l'étuve. Cette perte de toxicité peut être rapprochée de celle que subit la toxine au contact du formol; en effet, d'après les expériences de Ramon, l'activité d'une toxine formolée à 3,5 p. 100 tombe, après vingt-quatre heures à 37°, de 1/800 à 1/50; toutefois, dans l'action du formol, la destruction n'est pas complète après ce temps et se continue les jours suivants, tandis que l'oléate agit plus brutalement. Ainsi le mélange 100 cent. cubes tox. + 2 cent. cubes oléate reste toxique même après six mois, tandis que le mélange 100 cent. cubes tox. + 4 cent. cubes oléate est détruit après vingt-quatre heures.

On constate aussi que, soumise à la dialyse, l'activité de la toxine diminue nettement et cette atténuation est même, pour une part, proportionnellement plus accentuée que sous l'action d'un oxydant énergique tel que l'ozone. Comme il a été dit précédemment, la toxine n'est pas uniformément résistante. L'atténuation de la toxine formolée obtenue par Ramon se rapproche, dans ses phases différentes, de celle de la toxine dialysée.

Quel est maintenant le mécanisme d'inactivation des substances étudiées sur la toxine diphtérique?

Se trouve-t-on en présence d'une destruction totale et définitive du pouvoir toxique ou celui-ci est-il momentanément inhibé comme par une adsorption colloïdale?

Dans ce dernier cas, on pourrait rapprocher leur action du mécanisme d'union de la toxine avec l'antitoxine.

Dans les complexes toxine-antitoxine on parvient dans cer-



taines conditions (par addition d'acide, par action du froid) à séparer les deux composants et récupérer la toxine active.

Les nombreux essais de dissociation des complexes toxine-oléate et toxine-quinine que j'ai entrepris ne m'ont jamais permis de retrouver de la toxine active. Dans ces mélanges, la modification des substances chimiques était pourtant aisée; l'addition d'un acide ou d'une base suffisait au déplacement des molécules chimiques. Devant ces résultats négatifs, il semble donc que la toxine ait perdu, de façon définitive, sa toxicité première.

D'autre part, si, comme le dit Marie [24], « l'activité des toxines, corps auxquels on reconnaît aujourd'hui les attributs des colloïdes, passe pour être liée d'une façon très étroite à leurs propriétés physiques », il est étonnant que des substances comme l'éther et le chloroforme, dont l'addition à la toxine modifie notamment si profondément sa tension superficielle, n'ont aucune action désintoxiquante sur elle.

Quoique le mécanisme intime des réactions échappe encore à notre examen, on pourrait néanmoins émettre quelque hypothèse pour l'interpréter.

L'action exercée par ces divers agents est peut-être simplement catalytique d'une destruction qui s'effectue normalement dans la toxine avec une extrême lenteur. Il se pourrait également qu'ils forment avec le principe actif non encore isolé une combinaison spéciale et dans ce cas il faudrait attribuer à ce pouvoir toxique spécifique, une constitution nettement définie et considérer la toxine comme une véritable « substance chimique ».

## II

### Essai de la valeur antigène des toxines modifiées.

L'inactivation de la toxine diphtérique par les agents et les substances dont je me suis servi et dont j'ai étudié en détail le mode d'action dans ce qui précède devait tout naturellement m'amener à examiner leur valeur antigène.

Malgré la difficulté qu'on éprouve parfois à immuniser de petits animaux de laboratoire, cette recherche s'imposait afin de

découvrir des modifications nouvelles subies éventuellement par la toxine sous l'action de ces agents.

La disparition du pouvoir toxique, étudiée ci-dessus, peut résulter soit d'une destruction complète, soit d'une transformation de la toxine.

Ainsi, Ehrlich a remarqué que, dans les toxines vieilles, le pouvoir toxique a beaucoup diminué, tandis que le pouvoir de neutraliser l'antitoxine est resté le même. C'est sur cette constatation qu'il a basé sa théorie; il existerait dans la toxine divers groupements: le groupe toxique, le groupement toxoïde, non toxique mais fixant l'antitoxine, et d'autres produits tels que les toxones. En tous cas, l'immunisation antidiphtérique serait obtenue particulièrement par les toxoïdes.

Ces deux dernières années, Ramon a montré que l'addition de sérum antitoxique à la toxine diphtérique provoquait, dans certains mélanges, la formation d'un précipité floconneux qui se produit en premier lieu dans ceux où la toxine neutralise exactement l'antitoxine et qui est en rapport étroit avec le degré de toxicité. Par addition de formol il parvient à enlever à la toxine son pouvoir toxique tout en lui conservant ses propriétés immunisantes et floculantes. Sans entrer dans des considérations d'ordre théorique, il a dénommé anatoxine, et considère comme telle, une toxine qui, ayant perdu son pouvoir toxique, conserve la propriété de floculer en présence d'antitoxine et possède des propriétés immunisantes. La recherche de la valeur antigène des toxines atténuées que j'ai obtenues peut donc s'effectuer par divers procédés:

a) Par le degré d'immunisation obtenu sur des animaux injectés à une ou plusieurs reprises, avec des quantités déterminées de toxine modifiée;

b) Par la recherche des toxoïdes;

c) Par le degré de la floculation.

a) *Pour la première méthode*, dont les résultats présentaient le plus grand intérêt, je me suis servi de la technique suivante qui a été employée dans tous les cas:

Les animaux reçoivent par injection sous-cutanée, à vingt et un jours d'intervalle, 0 c. c. 5 et 1 cent. cube de toxine modifiée, quinze jours et un mois après la dernière injection, on recherche leur degré d'immunisation. Celui-ci peut être obtenu soit par

le titrage de l'antitoxine présente dans le sang (méthode de Ehrlich et de Römer), soit par la réaction de Schick effectuée avec des doses croissantes de toxine. Pour la facilité des manipulations, j'ai eu recours à cette dernière méthode et la réaction a été pratiquée avec  $1/50$ ,  $1/25$ ,  $1/10$  et  $1/5$  de dose mortelle dans 0 c.c. 2.

b) *La recherche des toxoïdes* est basée sur le fait que ces substances ont plus d'affinité pour le sérum antitoxique que pour la toxine elle-même. Elle consiste à laisser en contact pendant vingt-quatre heures, à la température du laboratoire, des mélanges renfermant exactement I. U. A. et 1 cent. cube de la substance supposée contenir des toxoïdes, la quantité de liquide étant amenée au volume de 4 cent. cubes par addition d'eau physiologique; à ajouter ensuite une dose L + de toxine dans ce premier mélange, et des quantités inférieures et décroissantes de toxine dans les autres; à laisser en contact vingt minutes, et à injecter alors par voie sous-cutanée chacun des mélanges à des cobayes. S'il y a des toxoïdes, ceux-ci, se fixant sur l'antitoxine et, annihilant son action, auront pour effet d'abaisser considérablement la quantité de toxine nécessaire pour tuer les animaux au quatrième jour.

c) *Recherche de la floculation.* — A des quantités fixes de toxine (10 cent. cubes) on ajoute des doses croissantes de sérum antitoxique. Je me suis servi du sérum sec préparé à l'Institut Pasteur de Paris que je dois à l'obligeance de M. Ramon. Les mélanges furent maintenus à la température de  $37^{\circ}$  et la lecture fut faite régulièrement.

\*  
\* \*

Quant au choix des animaux, j'ai pris le lapin comme animal d'expériences. D'après des recherches préliminaires effectuées par M. Henseval et moi, nous avons constaté que la réaction de Schick chez le lapin est beaucoup plus caractéristique que chez le cobaye. Il se montre également beaucoup plus sensible à l'injection intradermique de toxine diphtérique. Enfin, l'immunisation du lapin effectuée avec des mélanges toxine-antitoxine est au moins aussi régulière que celle du cobaye.



Afin de disposer d'une meilleure base de comparaison, j'ai tenu à revoir comment se comporte le lapin vis-à-vis de la vaccination par injection sous-cutanée de toxine non modifiée et j'ai constaté qu'en général ces animaux se vaccinent très difficilement et irrégulièrement par cette méthode et que les meilleurs résultats ne s'obtiennent qu'au bout de quatre mois et demi à six mois. Ceci concorde avec les résultats que Decroly [5] a relatés dans son travail : « l'action de la toxine et de l'antitoxine sur la nutrition générale ».

### § I. — VALEUR ANTIGÈNE

#### DE LA TOXINE INACTIVÉE PAR LA CHALEUR A 37°.

Une toxine diphtérique, stabilisée, active à 1/200, a été maintenue à l'étuve à 37° pendant six mois. Au bout de ce temps, elle avait perdu entièrement son pouvoir toxique.

A. J'ai recherché son pouvoir antigène en injectant sous la peau six lapins avec 0 c.c. 5 et 1 cent. cube de cette toxine, à vingt et un jours d'intervalle.

Voici les résultats obtenus :

Vingt et un jours après la dernière injection, les animaux ne présentaient aucune trace de vaccination ; après cinquante et un jours, 3 animaux sont vaccinés, c'est-à-dire qu'ils ne réagissent plus aux injections intradermiques de 1/50, 1/25, 1/10 et 1/5 de D. M. Après soixante-seize jours, cinq animaux ont un Schick négatif aux 4 doses ; le sixième réagit faiblement à 1/50, mais nettement au 1/25, 1/10 et au 1/5. Peu de temps après, deux animaux vaccinés meurent. Après cent quarante-six jours, le résultat chez les survivants ne s'est pas modifié. Après huit mois, l'animal qui réagissait positivement présente une réaction négative aux 4 doses.

B. J'ai recherché si la toxine étuvée renferme des toxoïdes. En effectuant un premier essai, suivant la méthode indiquée précédemment, je n'en ai pas trouvé. Toutefois l'augmentation de la quantité de toxine inactivée (3 cent. cubes au lieu de 1) m'a permis d'en déceler de très petites quantités.

C. Recherche du pouvoir flocculant. Je n'ai pu obtenir de flocculation avec ce produit, même avec un séjour prolongé au

bain-marie à la température de 45°. D'après Ramon, la toxine étuvée conserverait cependant son pouvoir de floculation, à part un retard dans son apparition.

## § II. — VALEUR ANTIGÈNE DE LA TOXINE OXYDÉE.

A. **POUVOIR IMMUNISANT.** — Le pouvoir immunisant de la toxine oxydée par l'ozone fut recherché sur 6 lapins qui reçurent 0 c. c. 5 et 1 cent. cube de toxine sous la peau. Deux animaux moururent avant la fin des épreuves de vaccination. Les réactions de Schick, effectuées vingt et un jours après la deuxième injection, furent positives à 1/50, 1/25, 1/10 et 1/5 de dose mortelle; après cinquante et un jours, on obtient les mêmes réactions. Après soixante-seize jours, 2 animaux présentèrent des réactions de Schick négatives et les deux autres ne montrèrent aucune trace de vaccination. Leur état n'était pas modifié cinq mois plus tard. Après huit mois, l'un des lapins à réaction positive meurt; l'autre présente une réaction négative à 1/50 et 1/25, positive à 1/10 et 1/5 de D. M. un an après la vaccination, les 3 lapins survivants présentent une réaction négative aux 4 doses.

La toxine oxydée ne possède donc qu'un faible pouvoir immunisant. Elle est beaucoup moins active que la toxine qui a séjourné à l'étuve à 37°, vu l'immunisation plus tardive et plus irrégulière qu'elle produit.

B. **RECHERCHE DES TOXOÏDES.** — La recherche des toxoïdes dans la toxine oxydée fut plus délicate à réaliser. Dans la première partie de ce travail, j'ai signalé que cette toxine modifiée neutralise déjà par elle-même une partie de la toxine fraîche et que cette propriété, qui se retrouve dans le bouillon et la toxine dialysée soumis tous deux à l'oxydation, était due aux acides contenus dans le milieu.

Il a donc fallu, au préalable, neutraliser la toxine avant l'addition d'antitoxine. Dans ces conditions, je ne suis pas parvenu à mettre en évidence la présence de toxoïdes.

C. Quant aux épreuves de floculation pratiquées avec la toxine oxydée, telle quelle ou après neutralisation à un  $pH$  voisin de celui de la toxine, elles furent négatives.

§ III. — RECHERCHE DU POUVOIR ANTIGÈNE  
DE LA TOXINE FORMOLÉE (ANATOXINE).

Dès les premières publications de Ramon sur la vaccination antidiphthérique au moyen de l'anatoxine, le professeur Henneval et moi avons étudié sa valeur antigène sur l'homme et sur les animaux (cobaye et lapin).

A. ESSAIS D'IMMUNISATION. I. CHEZ LE COBAYE. — Nous avons injecté à 9 cobayes, de 250 grammes environ, deux doses d'anatoxine, de 0,5 et 1 cent. cube, espacées de vingt jours. Douze jours après (à partir de la seconde injection) nous les avons soumis à l'épreuve de diphthérino-réaction avec  $1/50$ ,  $1/25$ ,  $1/10$  et  $1/5$  de dose mortelle; nous avons renouvelé la même épreuve seize jours et trente-neuf jours plus tard. Les résultats obtenus peuvent s'exprimer ainsi :

Après douze jours, 3 cobayes ont des réactions complètement négatives, les 6 autres incomplètement négatives; même résultat après seize jours; après trente-neuf jours, nous trouvons 2 cobayes présentant une réaction négative à  $1/50$  et  $1/25$ , légèrement positive à  $1/10$  et  $1/5$ .

II. CHEZ LE LAPIN. — Nous avons injecté à 10 lapins, d'environ 1.500 grammes, 0,5 et 1 cent. cube d'anatoxine à vingt-quatre jours d'intervalle; en outre, 2 lapins ont reçu, à titre de comparaison, une seule injection de 0 c. c. 5; onze jours plus tard, soit trente-cinq jours après la première injection, tous ces animaux sont soumis à l'épreuve de Schick avec  $1/50$ ,  $1/25$ ,  $1/10$  et  $1/5$  de dose mortelle. Les 10 premiers ont donné une réaction franchement négative, les 2 autres ont présenté une réaction négative à  $1/50$  et légèrement positive aux trois autres doses.

III. CHEZ L'HOMME. — A notre demande, M. Lomry et Dublé de Bovigny ont effectué la vaccination par l'anatoxine de 20 enfants, Schick positifs, 15 filles et 5 garçons; 6 étaient âgés de neuf à dix ans et quatorze de quatre à six ans; ils ont injecté 0,5 et 1 cent. cube d'anatoxine à vingt jours d'inter-



valle. La première injection n'a donné lieu à aucune réaction générale; ils ont simplement constaté un peu de rougeur et un empatement au point d'inoculation. Après la seconde injection, 4 enfants (3 filles et 1 garçon) ont été légèrement indisposés; on a observé un peu de fièvre, de la céphalée et de l'inappétence; au niveau de l'injection, on notait de la rougeur et de l'empatement. Quinze jours plus tard, soit trente-cinq jours après la première injection, on a soumis 16 enfants à l'épreuve de Schick avec 1/50 de D. M. de toxine; 15 ont donné une réaction négative; 1 seul une réaction positive; 4 ont échappé à l'épreuve.

*L'anatoxine diphtérique se montre donc une substance éminemment favorable et supérieure au mélange toxine-antitoxine pour la vaccination antidiphtérique.*

Je ferai remarquer en passant que le lapin se vaccine mieux et plus régulièrement que le cobaye.

B. RECHERCHE DES TOXOÏDES. — En procédant de la façon décrite précédemment j'ai pu abaisser la dose L + d'une toxine de 0,17 à moins de 0,05 par l'addition au mélange de 1 cent. cube d'anatoxine.

L'anatoxine contient donc en abondance des toxoïdes ou, plus exactement, des substances capables de neutraliser l'action de l'antitoxine. Il semble bien que le formol ne joue aucun rôle par lui-même, puisque le bouillon Martin traité par la chaleur et le formol ajouté à une toxine fraîche n'en modifient pas la dose L + et que l'anatoxine dialysée renferme, au même titre que l'anatoxine, des substances fixant l'antitoxine.

Comme on sait, d'autre part, que la toxine diphtérique chauffée à 80° pendant une demi-heure perd, en très grande partie, son pouvoir fixateur de l'antitoxine et que Ramon signale que l'anatoxine conserve son pouvoir de floculation, même après un chauffage à 80°, j'ai voulu vérifier et j'ai constaté que les toxoïdes contenus dans la toxine formolée résistaient à un chauffage à 80° pendant une demi-heure, ce qui confirme les résultats de Ramon. Il en résulte que ces substances, capables de fixer l'antitoxine, produites par l'action combinée de la chaleur et du formol, seraient thermostabiles, tandis que les toxoïdes sont thermolabiles.

C. RECHERCHE DE LA FLOCCULATION. — Je l'ai effectuée avec diverses anatoxines; les résultats obtenus m'ont montré que le pouvoir de flocculation se retrouve dans tous ces produits et est en rapport avec leur toxicité et leur pouvoir antigène.

J'ai montré dans le chapitre premier qu'on pouvait obtenir en neuf jours l'atténuation d'une toxine active, lorsqu'on la soumettait d'abord à la dialyse, ensuite à l'action combinée de la chaleur et du formol (3,5 p. 1.000). J'ai voulu me rendre compte de ses autres propriétés : pouvoir immunisant, présence de toxoïdes, pouvoir flocculant.

A. POUVOIR D'IMMUNISATION DES COBAYES. — A deux séries de 5 cobayes, j'injecte, à vingt jours d'intervalle, 0,5 et 1 cent. cube; 1 et 2 cent. cubes de la toxine précitée; *huit jours* après la seconde injection j'effectue un Schick au  $1/50$ ,  $1/25$ ,  $1/10$  et  $1/5$  de D. M.

Voici les résultats :

Dans la première série, 2 animaux ont une réaction négative aux quatre doses; 2, une réaction négative au  $1/50$ ,  $1/25$  et  $1/10$ , mais légèrement positive à  $1/5$ ; le cinquième réagit aux quatre doses.

Dans la seconde série, 4 animaux sur 5 ont une réaction négative aux quatre doses, 1 seul réagissant à toutes les quatre.

Le pouvoir immunisant est donc très appréciable si on considère que le cobaye n'est pas l'animal de choix et que les Schick ont été effectués huit jours après la seconde injection.

B. PRÉSENCE DE TOXOÏDES. — Les déterminations pratiquées ont permis de les retrouver en quantité aussi considérable que dans l'anatoxine.

C. FLOCCULATION. — J'ai opéré sur des mélanges renfermant 10 cent. cubes de toxine auxquels j'ajoute du chlorure de sodium pour amener le milieu à une concentration en sel voisine de celle de la toxine. J'ai pu obtenir une flocculation, mais celle-ci se produisit tardivement, soit après quatorze heures à l'étuve à  $37^{\circ}$  et quatre heures au bain-marie à  $45^{\circ}$ .

§ IV. — VALEUR ANTIGÈNE  
DU MÉLANGE TOXINE + OLÉATE DE SOUDE.

J'ai employé, pour mes essais d'immunisation, le mélange qui contient 100 cent. cubes de toxine active à 1/300 et 4 cent. cubes d'oléate à 1 p. 100 devenu atoxique par un séjour de vingt-quatre heures à 37°.

A. J'en ai injecté à 6 lapins 0,5 et 1 cent. cube à vingt et un jours d'intervalle; les épreuves ont donné les résultats suivants:

Après vingt et un jours (à partir de la deuxième injection), les épreuves de Schick étaient toutes positives. Après cinquante et un jours, 3 animaux présentent un Schick négatif avec 1/50, 1/25, 1/10 et 1/5 de dose mortelle. Le quatrième, un Schick positif au 1/5 de D. M. seulement; les deux autres animaux réagissent fortement à toutes les doses. Après cinq mois, le degré d'immunisation ne s'était pas modifié.

B. RECHERCHE DES TOXOÏDES. — La présence du mélange toxine-oléate modifie dans une légère mesure la dose de toxine correspondant à la dose L +; de 0,17 elle est descendue à 0,15. Il est vrai que cette différence de 0,2 cent. cubes est très minime, et peut être considérée comme se trouvant dans la limite des causes d'erreur. Aussi croyons-nous pouvoir la négliger.

C. ESSAIS DE FLOCCULATION. — La recherche du pouvoir flocculant de la toxine oléatée a été très difficile. En effet, l'addition de 4 cent. cubes d'oléate de soude à 1 p. 100 à 100 cent. cubes de toxine provoque une certaine opalescence suivie ultérieurement d'une légère précipitation. Je me suis efforcé d'y obvier autant que possible.

Il a été effectué d'une part quelques essais avec du liquide clair obtenu par décantation après sédimentation prolongée et d'autre part, avec du liquide soumis à la centrifugation. Avec ces mélanges, les résultats de la flocculation furent négatifs. Il en fut de même pour des mélanges dans lesquels le savon avait été décomposé par addition d'HCl, centrifugés, décantés et neutralisés.



## § V. — POUVOIR ANTIGÈNE DU MÉLANGE TOXINE-QUININE.

Les recherches ont été effectuées avec le mélange de bichlorhydrate de quinine dont l'action sur le pouvoir toxique a été trouvée la plus active et la mieux étudiée.

J'ai opéré, pour l'immunisation des animaux, à peu près comme précédemment.

A. Huit lapins reçurent en injection sous-cutanée, à vingt jours d'intervalle, 0 c.c. 5 et 1 cent. cube de toxine inactivée par le bichlorhydrate de quinine. Trois autres lapins reçurent en plus une troisième injection de 1 cent. cube, huit jours après la seconde. Tous furent soumis à des moments divers à l'épreuve de Schick, avec  $1/50$ ,  $1/25$ ,  $1/10$  et  $1/5$  de dose mortelle.

Voici les résultats :

Après vingt et un jours, des 8 animaux ayant reçu deux injections, 6 donnent une réaction négative à  $1/50$ ,  $1/25$ ,  $1/10$ , mais positive à  $1/5$ ; 2 autres réagissent positivement aux 4 doses.

Après cinquante et un jours, 4 animaux donnent une réaction négative aux 4 doses; 2, une réaction positive seulement à  $1/5$ ; 2, une réaction positive aux 4 doses. Après soixante-seize jours, 7 animaux sur 8 présentent une réaction positive aux 4 doses; le huitième donne une réaction positive aux 4 doses, qui l'est encore cinq mois après les injections.

Les trois animaux qui ont reçu trois injections successives donnent aux 4 doses une réaction négative qui s'est maintenue au moins pendant six mois.

Le pouvoir antigène se montre donc appréciable pour le mélange toxine-quinine.

B. PRÉSENCE DE TOXOÏDES. — Cette recherche a été négative, soit qu'on emploie le mélange tel quel, soit qu'on le débarrasse de la quinine qu'il contient par alcalinisation et centrifugation.

C. RECHERCHE DE LA FLOCCULATION. — Elle présente, comme pour le mélange oléaté, une certaine difficulté tenant à ce que

l'addition de la quinine au mélange provoque déjà l'apparition d'un léger précipité. J'ai toutefois tenté des essais en me débarrassant de la quinine par alcalinisation et centrifugation, en m'assurant que l'alcalinité n'entravait pas la réaction. J'ai effectué le même essai en ramenant la réaction alcaline à un  $pH$  voisin de celui de la toxine. Bien que possédant des liquides parfaitement limpides, l'addition d'antitoxine ne m'a pas permis de constater la moindre floculation.

### Considérations générales.

Parmi les produits examinés, il paraît évident que l'anatoxine diphtérique de Ramon possède un pouvoir immunisant très marqué. Son efficacité dépasse notablement celle des mélanges toxine-antitoxine. D'un autre côté, il est un fait qui frappe également, c'est que l'anatoxine contient en quantité considérable des substances capables de se fixer sur l'antitoxine. Si on examine comparativement la valeur antigène des autres substances étudiées, on voit que celle-ci est progressivement décroissante dans l'ordre suivant : mélange toxine-quinine ; toxine étuvée ; mélange toxine-oléate ; toxine oxydée.

La recherche des toxoïdes dans ces différents antigènes établit également une différence marquée entre l'anatoxine et les autres substances. Alors que la quantité de toxoïdes dans ces dernières est relativement minime ou nulle, l'anatoxine en renferme une quantité considérable ; il me paraît plausible d'attribuer la supériorité de ce produit comme antigène à la présence des « toxoïdes ». J'emploie ce terme dans le sens proposé par Ehrlich pour désigner des substances qui, sans être toxiques, sont capables de neutraliser l'antitoxine et auxquelles cet auteur attribue surtout le pouvoir antigène. Toutefois, je ne partage pas l'opinion des auteurs anglais, notamment Glenny [13] et [14] ses collaborateurs, qui ne veulent voir dans l'anatoxine qu'une des nombreuses manières de préparer des « produits riches en toxoïdes » et qui estiment qu'on ne doit pas appliquer un nom nouveau à l'une ou à l'autre de ces préparations. Glenny admet, *a priori*, que les toxines modifiées renferment toutes de grandes quantités de toxoïdes. Or, d'après

mes expériences, je ne crois pas que les toxines modifiées contiennent toutes les mêmes proportions de toxoïdes; ainsi les toxines modifiées par l'ozone, l'oléate de soude et la quinine n'en renferment pas. De plus, les « toxoïdes » de l'anatoxine ne me paraissent pas être de même nature que ceux des toxines vieilles, puisque les premiers résistent au chauffage d'une demi-heure à 80°, tandis que les seconds sont détruits. Par conséquent, j'admets non seulement le terme nouveau d'anatoxine, mais j'estime qu'on pourrait dénommer « anatoxoïdes » ces substances thermostabiles qui y sont contenues.

Il n'a pas été fait mention dans tout ceci de la toxine dialysée soumise à l'action du formol et de la température (37°), parce que, comme l'anatoxine, elle immunise activement, floccule et contient de grandes quantités d'anatoxoïdes.

J'ajouterai enfin que la valeur antigénique ne me paraît pas exclusivement liée à la présence des toxoïdes ou d'anatoxoïdes, puisque des toxines inactivées par la quinine notamment, qui en sont dépourvues, possèdent cependant un pouvoir immunisant appréciable, mais l'immunité qu'elle confère est plus tardive.

### Conclusions.

1° La toxine diphtérique dialyse peu et lentement à travers les membranes de collodion.

2° Débarrassée des substances dialysables qui l'accompagnent, la toxine diphtérique perd rapidement une grande partie de son pouvoir toxique; toutefois l'atténuation *complète* ne s'obtient qu'après un séjour prolongé à l'étuve.

3° L'ozone agit directement sur la toxine diphtérique pour la détruire, mais celle-ci est relativement résistante à son action;

4° La toxine dialysée est plus rapidement attaquée par l'ozone. Sous l'influence de  $O_3$ , il se forme au sein de la toxine des fonctions acides comme dans la toxine brute.

5° Dans l'anatoxine, le formol se fixe en grande partie sur des substances étrangères à la toxine, particulièrement sur les substances dialysables.

6° La toxine diphtérique est détruite rapidement par l'action combinée de petites quantités d'oléate de soude et de la chaleur.



de l'étuve. Cette destruction est définitive; la toxine ne peut être régénérée comme dans le mélange toxine-antitoxine. Il est difficile d'expliquer son mode d'action par une diminution de la tension superficielle.

7° Les sels de quinine, particulièrement le bichlorhydrate et le bisulfate, détruisent certaines quantités de toxine diphtérique et celle-ci ne peut être régénérée.

8° La toxine diphtérique, modifiée par les diverses substances étudiées, conserve ses propriétés immunisantes à des degrés divers. Parmi les toxines atténuées, l'anatoxine s'est trouvée la plus active pour l'immunisation et peut être avantageusement employée dans la pratique.

9° Le pouvoir antigène des autres toxines modifiées se classe dans l'ordre décroissant suivant : mélange toxine-quinine; toxine étuvée; mélange toxine-oléate; toxine ozonisée.

10° La richesse en toxoïdes des toxines atténuées n'est pas toujours parallèle à leur pouvoir antigène; ainsi le mélange toxine-quinine qui possède un pouvoir antigène assez élevé, ne renferme pas de toxoïdes.

11° Il existe, dans les toxines atténuées, des substances thermostabiles qui peuvent être considérées comme toxoïdes dans le sens d'Ehrlich et, dans certains cas (anatoxine), des toxoïdes thermostabiles qu'on pourrait dénommer « anatoxoïdes ».

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BEHRING. *Gesammelte Abhandlungen*, 1915, Bonn.
- [2] BERTHELOT et RAMON. *C. R. des Sciences*, 180, janv. 1923, p. 340.
- [3] BUSSON et LOEWENSTEIN. *Zeitschr. f. exp. Path.*, 1914.
- [4] CALCATERA. *Ann. d. Ins. Maragliano per lo stud. el la cura d. tub.*, 1910, Genova, 4, p. 235.
- [5] DE CROLY. *Arch. de Pharmacodyn.*, 4, 1898, p. 385.
- [6] DE POTTER (F.). *C. R. Soc. Biol.*, 89, juin 1923, p. 422; *Bull. Acad. Médec.*, juin 1923.
- [7] DE WAELE. *Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Originale*, 3, 1909, p. 478.
- [8] DOERR. *Biochem. Zeitschr.*, 7, 1908, p. 128.
- [9] EHRLICH. *Deutsch. med. Woch.*, 34, 1898, p. 597; *Berl. klin. Woch.*, 1903, p. 35; *Berl. med. Woch.*, 41, 1904, p. 680.
- [10] EISLER et LOEWENSTEIN. *Centr. f. Bact.*, 1911, 1912, 1913, 1915.
- [11] FILIA. *Biochem. e terap. sper. Milano*, 3, 1911, 1912, p. 201.
- [12] GAMALEIA. *Les poisons bactériens*, Paris, 1892.
- [13] GLENNY, HOPKINS et POPE. *Journ. of Pathol. and Bact.*, juillet 1924.

- [14] GLENNY, BARBARA et HOPKINS. *Brit. Jour. of exp. Pathol.*, **4**, n° 5, 1923, p. 283.
- [15] GLENNY et SUDMENSEN. *Journ. of Hygiene*, **20**, 1921, 176.
- [16] HENSEVAL et NÉLIS. *C. R. Soc. Biol.*, **91**, p. 1162; *C. R. Soc. Biol.*, **91**, p. 902.
- [17] KRÜGER. *Deutsch. med. Woch.*, 1895, p. 331.
- [18] LARSON et NELSON. *Proc. of the Journ. of exp. Biol. and Med.*, 1924.
- [19] LE FÈVRE DE ARRIG. *C. R. Soc. Biol.*, **82**, 1919, p. 1143.
- [20] LOEWENSTEIN (F.). *Zeitsch. f. Hyg.*, 1909, **62**, p. 491; *Deutsch. med. Woch.*, 1921, p. 833.
- [21] LOWY. *Centr. f. Bacter.*, I. Abt. Orig. **84**, 1920, p. 61.
- [22] MALFITANO, in KOPACZEWSKI. *Théorie et pratique des colloïdes*, 1923, p. 70, Paris.
- [23] MAC BAIN et LEWIS (W. C. M.). *Traité de chimie phytol.*, **2**, 1921, p. 290.
- [24] MARIE (A.). *Ces Annales*, **27**, 1923, p. 294.
- [25] MARMIER. *Ces Annales*, 1896, p. 469.
- [26] PICO et MIRAVENT. *C. R. Soc. Biol.*, **94**, n° 7, 1926, p. 484.
- [27] RAMON. *Ces Annales*, **37**, déc. 1923, p. 1001; **38**, janv. 1924, p. 1; **39**, janv. 1925, p. 1; *C. R. Acad. des Sciences*, **177**, 1923, p. 1338; *C. R. Soc. Biol.*, 1925, p. 1432.
- [28] RÖMER. *Zeitsch. f. Immunit.*, **3**, p. 208.
- [29] ROUX et YERSIN. *Ces Annales*, **2**, 1889, p. 629; **3**, 1889, p. 273; **4**, 1890.
- [30] RUSS et RAUBITSCHK. *Zeitsch. f. Immunit. Origin.*, **1**, 1909, p. 395.
- [31] SMIRNOW. *Berl. klin. Woch.*, 1894, p. 683 et 1895, p. 645 et 675.

**DE LA VACCINOTHÉRAPIE  
DES INFECTIONS A STAPHYLOCOQUES  
ET A STREPTOCOQUES CHEZ LE CHEVAL  
AU MOYEN DES BOUILLONS-VACCINS DE BESREDKA**

par I. I. SADOVSKY.

*(Laboratoire vétérinaire de bactériologie, Kharkoff.)*

PREMIER MÉMOIRE

L'accord n'est pas encore fait sur le mode d'action des vaccins spécifiques, employés à titre curatif. L'opinion qui domine est celle de Wright, d'après qui la vaccinothérapie est de l'opsonothérapie. Un grand nombre de savants ne croient pas cependant qu'il y ait lieu d'attribuer aux opsonines seules les modifications si complexes que l'organisme subit au cours de l'immunisation. Notons que la plupart des cliniciens n'attachent pas d'importance à l'indice opsonique et n'envisagent pas ce dernier comme base de la vaccinothérapie.

Les recherches de Besredka et de ses élèves, sur l'immunisation locale, furent le point de départ d'une nouvelle conception de l'immunité et de nouvelles méthodes en vaccinothérapie.

La doctrine de Besredka est aujourd'hui suffisamment connue; nous nous bornerons à en dire quelques mots avant de passer à la description des résultats obtenus dans le traitement des chevaux atteints d'infections à staphylocoques et à streptocoques.

\*  
\* \*

On sait que, à la suite de ses expériences sur des cobayes infectés avec des races virulentes de staphylocoques et de streptocoques, le professeur Besredka a été conduit à penser que l'immunité antistaphylococcique et antistreptococcique pouvait offrir une analogie avec celle que l'on observe dans le



charbon : dans toutes ces infections, le maximum d'immunité s'obtient par vaccination cutanée ou intracutanée ; dans toutes ces infections, l'immunité a pour siège de prédilection la peau et n'est jamais accompagnée de formation d'anticorps ; en d'autres termes, l'immunisation est locale.

Au début de ses recherches, Besredka employa, en qualité de vaccin, des cultures entières de staphylocoques en bouillon, tuées par la chaleur. Dans la suite, il modifia sa technique : partant de l'idée que le principe vaccinant devait résider, moins dans les corps mêmes des microbes, que dans les produits solubles, issus de ces microbes, ayant diffusé dans le milieu ambiant, Besredka eut recours à des cultures filtrées ; de là est née la conception des antiviruses et la technique de leur préparation.

Les filtrats obtenus avec des cultures de staphylocoques en bouillon sont capables d'arrêter le développement des microbes correspondants. A cette propriété, que l'on constate *in vitro*, correspond le pouvoir que possèdent ces filtrats d'empêcher l'infection *in vivo*. La substance contenue dans ces derniers résiste à la stérilisation ; elle est spécifique et manifeste une affinité élective, comme le virus lui-même, pour la peau.

Il ressort des expériences de Besredka sur des cobayes que les filtrats, appliqués sur la peau, possèdent un pouvoir vaccinant à un degré plus notable que celui qui appartient aux corps de microbes.

« Il semble donc qu'il existe à l'intérieur du staphylocoque, à côté d'un virus qui est sensible à la chaleur, qui est adhérent au corps du microbe et qui est responsable des lésions cutanées graves et, occasionnellement, de la mort, une autre substance, atoxique, insensible à la chaleur, qui se détache facilement du corps du microbe et agit à la façon d'antagoniste ; nous l'appelâmes provisoirement, pour la commodité du langage et pour éviter de longues circonlocutions, « antiviruse ». Issus du staphylocoque, virus et antiviruse sont strictement spécifiques ; tous les deux possèdent une affinité élective pour l'appareil cutané » (1).

(1) A. BESREDKA. *Immunisation locale*, p. 76 ; Masson, 1925.

Pour ce qui est du mécanisme de la vaccination vis-à-vis des cocci pyogènes, on sait qu'il réside, d'après Besredka, dans la saturation des cellules réceptives de la peau par l'antivirus; cette saturation a pour effet leur désensibilisation, partant la disparition de l'affinité à l'égard du virus.

En pratiquant la vaccinothérapie, nous ne devons donc pas chercher à renforcer la production des anticorps. Notre but doit être de veiller aux cellules réceptives saines, situées au voisinage du virus. En circonscrivant ainsi le foyer de l'infection, nous contribuons à accélérer la guérison. En faisant agir l'antivirus sur la région atteinte, nous agissons directement sur le virus et, en même temps, nous vaccinons les tissus qui ne sont pas encore atteints : il s'agit en ce cas d'une double action, également salutaire à l'organisme. Le vaccin doit donc être employé de façon qu'il se trouve en contact immédiat avec le foyer infecté; de là les applications en pansement, en cas de plaie ouverte, des lavages à l'antivirus en cas de fistule, des instillations répétées dans les affections de l'œil, des tamponnements dans les affections utéro-vaginales, des injections intrapleurales ou intraveineuses en cas de pleurésie et de septicémie générale.

« Le pansement spécifique, à base des cultures filtrées, agit à la fois sur les microbes et sur les cellules : il arrête la pullulation des uns, il active les fonctions défensives des autres. Ce pansement réunit les avantages du pansement antiseptique et du pansement aseptique, sans en avoir les inconvénients; il offre, en plus, cet avantage, qui ne se trouve dans aucun des deux, qui est d'agir d'une façon spécifique sur les cellules et sur les microbes » (1).

\*  
\* \*

L'efficacité, aujourd'hui bien établie, des filtrats-vaccins en médecine humaine, nous incita à les essayer en médecine vétérinaire. Les affections à staphylocoques et à streptocoques chez les animaux, chez le cheval, en particulier, sont très fréquentes et aussi variées que chez l'homme. En plus des maladies qui sont communes à l'homme et aux animaux et qui

(1) *Loco citato*, p. 120.

se traduisent par des suppurations étendues, des plegmons, des plaies infectées, etc., on connaît, en clinique vétérinaire, des infections générales où le streptocoque apparaît soit comme le seul agent pathogène, soit comme l'agent d'infections associées graves : la gourme, dans laquelle le rôle du *streptococcus equi* de Schutz n'est pas encore suffisamment élucidé, la pleuropneumonie contagieuse, l'anasarque pétéchiale (*morbis maculosus*).

Au début de nos recherches, nous employions des auto-bouillons-vaccins; dans la suite, nous avons eu recours aux filtrats obtenus avec le mélange de six ou huit souches de staphylocoques et streptocoques isolées au cours des affections variées du cheval. Comme à l'Institut bactériologique de l'Ukraine, nous faisons usage des cultures âgées de deux semaines, filtrées une seule fois. Les staphylocoques étaient cultivés dans du bouillon peptoné ordinaire; les streptocoques — dans le même bouillon, additionné de 1 p. 100 de glucose ou de 2 p. 100 de miel. Aussitôt après filtration sur bougies Berkefeld, on ajoutait de 1/4-1/2 p. 100 d'acide phénique.

Voici les affections que nous avons traitées par des filtrats-bouillons-vaccins; elles peuvent être divisées en quatre groupes :

1° Affections de nature staphylococcique ou streptococcique pure : parotidite (1 cas), mal de garrot avec fistule (1 cas), crevasses suppurées (1 cas), plaies étendues de l'avant-bras et de la cuisse (2 cas);

2° Affections de nature inconnue, compliquées d'infections à streptocoques : le javart cutané des chevaux (15 cas);

3° Affection probablement d'origine streptococcique : anasarque pétéchiale (1 cas);

4° Gourme; celle-ci était traitée par un filtrat-vaccin spécial, obtenu avec des streptocoques isolés des cas de gourme; ce vaccin est actuellement essayé sur une vaste échelle dans toute notre région.

OBSERVATION I. — « Barsoutka ». Entre au lazaret le 14 juin 1925 pour une angine, compliquée, dans la suite, d'une inflammation de la glande parotide avec fistule; la tuméfaction a 15 centimètres de long sur 6 à 7 centimètres de large; la fistule, d'où l'on voit s'échapper du pus d'une façon ininterrompue, s'étend le long de la tumeur jusqu'à la base de l'oreille. L'animal est soumis au traitement ordinaire; après quatre mois, on ne constate aucun résultat. Seule l'angine est guérie.



L'examen bactériologique du pus révèle la présence de staphylocoque blanc, à l'état pur.

12 octobre : On injecte *dans l'épaisseur* de la glande parotide et *dans la peau* de la région saine environnante, en 5 à 6 points différents, 5 cent. cubes de filtrat-bouillon-vaccin, obtenu avec le staphylocoque blanc, isolé chez le cheval malade.

13 octobre : Diminution notable de la tumeur dans sa partie inférieure.

14 octobre : Nouvelle injection de 20 cent. cubes de filtrat, principalement dans la partie supérieure de la tumeur.

16 octobre : La tuméfaction persiste dans la partie supérieure où elle est même légèrement augmentée de volume. Injection de 20 cent. cubes de filtrat.

19 octobre : On constate un abcès fluctuant dans la moitié supérieure de la tumeur. Après incision, il s'en écoule une grande quantité de pus, d'abord pur, puis mélangé à du sang.

Injection de 10 cent. cubes de filtrat et lavage de la cavité de l'abcès au filtrat.

20 et 21 octobre : A l'examen bactériologique du pus, on trouve des streptocoques, mélangés à des staphylocoques blancs.

22 octobre : OEdème autour de l'incision de l'abcès; la fistule est encore longue, mais elle ne sécrète plus de pus. On injecte dans l'épaisseur du tissu, parallèlement à la fistule, 40 cent. cubes de filtrat staphylo-streptococcique (à parties égales); la cavité de l'abcès est lavée au même filtrat mixte.

23 octobre : La cavité de l'abcès est comblée. La plaie a très bon aspect; l'orifice de la fistule se recouvre d'une croûte sèche.

26 octobre : La plaie s'est fermée. La sonde, introduite par l'orifice fistulaire, accuse un fort rétrécissement du conduit. Le tampon qui en est retiré est sec. La fistule est lavée au filtrat. Le cheval est laissé en observation.

30 octobre : Guérison complète. A la place de l'ancienne tumeur, on trouve une légère induration de la peau. Pendant les deux mois qui suivent, le cheval reste en observation : il n'y eut pas de récurrence; la fistule ne s'est pas rouverte.

OBSERVATION II. — « Debet ». Entre au lazaret le 18 août 1925 avec le diagnostic : mal de garrot au troisième degré, avec trajets fistuleux multiples, allant jusqu'aux vertèbres. A été longtemps traité sans résultat.

L'examen bactériologique du pus, prélevé dans la partie profonde des fistules, révèle la présence des staphylocoques en culture pure.

1<sup>er</sup> octobre : Les trajets des fistules sont lavés à l'auto-filtrat-bouillon-vaccin.

2 octobre : On injecte dans la peau, de deux côtés des trajets fistuleux, en six points différents, de 0 c. c. 2 à 0 c. c. 3 de filtrat bouillon-vaccin; les trajets sont lavés avec le même filtrat.

3 et 4 octobre : Lavage des fistules au filtrat.

5 octobre : Les bords des orifices fistuleux sont notablement surélevés par du tissu oedémateux. Au niveau des fistules on note une sécrétion abondante de pus. A l'incision d'un abcès fluctuant, du côté gauche, on retire près de cinq verres de pus, renfermant des streptocoques à l'état pur. Lavages des trajets fistuleux au filtrat mixte (staphylo-streptococcique).

6 octobre : L'oedème a disparu; la sécrétion de pus est insignifiante.

On interrompt le traitement jusqu'au 20 octobre ; on prépare une nouvelle provision de filtrat.

20 octobre : On constate une légère induration de la peau au niveau des fistules : celles-ci sont recouvertes d'une croûte sèche ; la cavité de l'abcès est remplie de tissu de granulation. On injecte dans la peau, en beaucoup de points, jusqu'à 30 cent. cubes de filtrat mixte staphylo-streptococcique. On lave la cavité au même filtrat.

23 au 31 octobre : Tamponnement au moyen de compresses imbibées de filtrat.

31 octobre : Il reste un trajet étroit de 5 centimètres de longueur, dans lequel la sonde entre avec difficulté. La suppuration est insignifiante, mais elle persiste.

2 novembre : La suppuration n'existe plus. 4 novembre : La fistule s'est refermée. On laisse le cheval en observation.

21 novembre : De deux côtés du garrot, autour des anciens orifices fistuleux, on constate des tuméfactions qui augmentent chaque jour ; le 25 novembre : récurrence ; ouverture d'abcès avec beaucoup de pus. Lavages quotidiens au filtrat mixte.

La récurrence étant probablement due à la présence des foyers profonds, inaccessibles à l'action locale du vaccin, on procède le 1<sup>er</sup> décembre à l'injection intraveineuse de 80 cent. cubes de filtrat mixte. Deux heures après : température, 39°5 ; pouls, 56 ; respirations, 30 ; état général déprimé ; quatre heures après : température, 40°2 ; pouls, 60 ; respirations, 36 ; six heures après : la température, 41°5 ; pouls, 66 ; respirations, 33 ; état de dépression considérable. L'animal est couché ; pas d'appétit ; le lendemain : température, 39°4 ; pouls, 46 ; respirations, 46 ; état général satisfaisant ; appétit faible ; le surlendemain : état excellent ; température, respirations et pouls sont normaux.

La sécrétion de pus cessa le troisième jour qui a suivi l'injection.

A la suite des lavages quotidiens au filtrat mixte, pendant dix jours, il a été constaté une cicatrisation complète et la fermeture des trajets fistuleux au moyen des tissus de granulation.

OBSERVATION III. — « Dina ». Diagnostic : crevasses gangreneuses profondes de la jambe postérieure droite ; claudication légère. A l'examen bactériologique : staphylocoques et streptocoques. Des compresses Besredka, imbibées du filtrat mixte, tous les jours.

Après sept jours de traitement, le manque de substance, au niveau du boulet, est comblé par du tissu granuleux normal ; la claudication cessa après 3 ou 4 compresses.

Trois jours après, la guérison est complète. Pendant les deux mois qui ont suivi, il n'y a pas eu de récurrence.

OBSERVATION IV. — « N° 26 » (en collaboration avec le vétérinaire W. A. Bantlé).

Plaie déchiquetée de l'avant-bras droit, longue de 15 centimètres et large de 6 centimètres, recouverte de croûtes suppurées. A la partie moyenne de la plaie, trajet allant jusqu'à l'os ; dans la partie droite, trajet profond aboutissant sous la peau. Les bords de la plaie sont œdématisés et douloureux. Claudication prononcée. Œdème de l'avant-bras entier.

Un streptocoque, à l'état pur, est isolé du pus. On prescrit des lavages et des pansements au filtrat. Après 12 pansements, la guérison est complète.

Après le premier pansement : sécrétion abondante de pus ; la surface de la plaie est recouverte de granulations ; les parties profondes des trajets sont sans changement ; l'œdème de l'avant-bras est à peine perceptible.

Après le deuxième pansement : les granulations sont en excellente voie ; les bords de la plaie se recouvrent de peau ; le bord intérieur est encore épaissi ; les trajets, central et sous-cutané, se comblent et diminuent notablement ; la surface de la plaie est moins étendue ; l'œdème de l'avant-bras a disparu ; l'animal ne boite plus ; la compresse est imbibée de pus.

Après le troisième pansement : la plaie est rétrécie ; ses bords sont égalisés ; le trajet sous-cutané s'est refermé ; le trajet central sécrète encore du pus en abondance.

Après le cinquième pansement : la surface de la plaie est nette ; la totalité du pus (sécrété par le trajet central) se retrouve sur la compresse ; le trajet est comblé ; à l'examen digital, on fait sourdre un peu de sang.

Après le huitième pansement : les bords de la partie supérieure de la plaie sont rapprochés ; la surface est tout à fait nette.

Après le dixième pansement : la partie supérieure de la plaie est couverte d'une croûte sèche.

Après le onzième pansement : la plaie n'a que 3 centimètres ; elle est sèche.

Après le treizième pansement : la guérison est complète.

OBSERVATION V. — « Myrthe » (en collaboration avec le vétérinaire L. N. Dobrogorsky).

Plaie contuse de la cuisse, ayant 5 centimètres en profondeur ; l'étendue de la plaie est de  $16 \times 5$  centimètres ; le trajet sous-cutané le long de la cuisse est de 10 à 12 centimètres ; la cuisse et la région présternale sont tuméfiées ; le cheval ne peut pas s'appuyer sur son pied ; la sécrétion de pus est abondante.

A l'examen du pus prélevé en profondeur : staphylocoque doré et streptocoque.

On pratique une contre-ouverture à l'extrémité inférieure du trajet sous-cutané.

La plaie ne se prêtant pas aux pansements, on applique des tampons imbibés de filtrat mixte. Après cinq tamponnages, on procède pendant seize jours au lavage avec du filtrat mixte.

Trois jours après le premier tamponnement, la tuméfaction de la cuisse a disparu ; le cheval a pu s'appuyer sur le pied. Pendant les six premiers jours du traitement, on note une sécrétion abondante de pus, qui diminue ensuite et cesse complètement vers le vingtième jour. Vers le dixième jour, le cheval commence déjà à courir. La cavité de la plaie se comble ; trois semaines après le début du traitement, il ne reste que de petites cicatrices, sans traces de pus, tout à fait nettes.

En collaboration avec le vétérinaire W. A. Bantlé, nous avons essayé l'action du filtrat-vaccin chez les chevaux atteints de javart cutané (potchetchouï).

Cette affection, rappelant les crevasses gangreneuses, s'observe tous les ans sur les étalons de nos haras. Elle offre



un caractère épidémique; sa mortalité est très variable : de 1 1/2 pour 100 jusqu'à 40 p. 100.

Voici comment évolue cette maladie : la surface postérieure et inférieure du boulet se tuméfie; elle est tendue et suintante; le poil est hérissé; le tout s'accompagne d'une légère claudication. Au bout de un à deux jours, on voit se détacher, au niveau de la région enflammée, un fragment de peau nécrosée; le tissu sous-jacent est en état de décomposition sanieuse; les tendons sont à nu; la température atteint 40-40°1; suivant le cas, l'animal guérit au bout d'un temps très long ou bien succombe au milieu des phénomènes septicémiques.

La « potchetchouï » a pour siège de prédilection soit le paturon, soit plus rarement la surface antérieure du boulet. La claudication est presque la règle. On voit d'abord la peau devenir humide sur une étendue large comme un œuf de pigeon; puis, elle se détache, en laissant une ulcération à bords indurés, avec un contenu sanieux. La plaie peut gagner ensuite le cartilage complémentaire du pied, les ligaments et les gaines tendineuses. En pressant sur la plaie, on fait sortir une gouttelette de pus d'un petit orifice qui n'est pas plus gros qu'une tête d'épingle. L'examen à la sonde permet de pénétrer très profondément, jusqu'à l'articulation du sabot. Les complications qu'il est donné d'observer sont : fistules du cartilage du sabot, phlegmon de la couronne, inflammation suppurée des articulations du sabot et de la couronne, enfin, septicémie.

L'examen bactériologique de pus, prélevé dans la profondeur chez six chevaux, a révélé la présence de streptocoques à l'état pur. Si ce microbe n'est pas l'agent spécifique de la maladie, son rôle est certainement extrêmement important.

Quinze chevaux, atteints de javart cutané, à des stades divers, ont été traités au moyen de pansements de Besredka au filtrat streptococcique; ce dernier a été obtenu avec une seule souche de streptocoque, isolée dans un cas de « potchetchouï ». Dans tous les cas, les résultats ont été même surprenants : des fistules, restées rebelles au traitement médicamenteux pendant des mois, cédèrent en moins de quinze jours au traitement par pansements. Dans aucun de ces cas, il ne fut observé de récidives, si fréquentes cependant dans cette affection.

Pour activer la guérison, nous avons essayé, au début,

d'injecter de petites quantités de filtrat dans l'épaisseur des tissus malades; nous y avons renoncé aussitôt, car il y eut, à la suite de ces injections, de fortes réactions, sous forme d'œdème douloureux et de claudications.

Chez tous nos malades, nous avons employé uniquement des pansements spécifiques, renouvelés tous les jours, puis des lavages des trajets fistuleux au filtrat.

Voici quelques observations aimablement fournies par W. A. Bantlé.

OBSERVATION IV. — « Milady ». A contracté le 19 août 1925 un javart cutané compliqué d'une fistule du cartilage du sabot. Du 10 décembre au 25 décembre, on emploie, à titre d'essai — mais pas d'une façon régulière — du vaccin spécifique, concurremment avec le traitement médicamenteux.

Autour de l'orifice de la fistule, le tissu est tuméfié; l'œdème est diffus. Le trajet fistuleux a 4 centimètres de profondeur; il sécrète du pus grisâtre en petite quantité. L'animal boite légèrement.

25 octobre. Injection de vaccin (2 cent. cubes) dans l'épaisseur de la tumeur, en six endroits; injection de vaccin (0 c. c. 5) dans la peau saine du tissu environnant. Application d'un pansement Besredka. Température 38°9; l'appétit est bon.

Premier pansement : réaction modérée au point de l'injection; pas de sécrétion de pus; l'orifice de la fistule est sec.

Deuxième pansement : ce dernier est presque sec; on aperçoit un tout petit peu de pus jaunâtre; l'œdème et la douleur ont disparu; à la pression, on ne fait plus sourdre de pus; le cartilage du sabot commence à se dessiner nettement; la démarche est encore défectueuse.

Troisième pansement : celui-ci est tout à fait sec; il n'y a plus de pus; le pourtour de la région malade est un peu endolori; la tuméfaction, au niveau du cartilage, persiste; la démarche est plus assurée.

Quatrième pansement : la claudication a disparu; au niveau d'un des points injectés, on constate un abcès, gros comme un pois.

Cinquième pansement : l'abcès est cicatrisé; le tissu environnant est redevenu normal.

Le cheval quitte l'hôpital sept jours plus tard.

OBSERVATION VII. — « N° 27 ». Javart cutané de la jambe postérieure gauche, avec fistule du cartilage. Est en traitement depuis deux mois, sans résultat appréciable. Injection de filtrat dans le tissu malade, autour de l'orifice fistulaire, en quatre points différents (0 c. c. 5); le trajet fistuleux est lavé au filtrat; pansement au filtrat. Dans la suite, pendant neuf jours, on fait un pansement au filtrat par jour.

Premier pansement : pus blanc grisâtre sortant de l'orifice de la fistule; au niveau de l'injection, œdème non douloureux et tension des tissus.

Deuxième pansement : le trajet se comble; l'orifice de la fistule est de couleur rose; il sort un peu de pus jaune; léger œdème du tissu couronnant.

Quatrième pansement : celui-ci est presque sec; la sonde pénètre à 2 centimètres de profondeur.

Huitième pansement : pas de pus; on ne peut plus introduire la sonde.

Neuvième pansement : le trajet de la fistule est fermé. Six jours après, le cheval quitte l'hôpital.

OBSERVATION XII. — « N° 36 ». Ancienne fistule du cartilage du sabot, suite de javart cutané. Depuis deux mois, la fistule ne cède à aucun traitement médicamenteux. La région du cartilage du sabot extérieur, à la jambe postérieure gauche, est œdématisée, indurée, mais non douloureuse. Au-dessus de la couronne, on voit un orifice fistulaire, conduisant à 3 centimètres de profondeur. A la pression, on fait sortir un peu de pus jaunâtre. Pas de claudication.

Premier pansement : il n'y a plus de sécrétion ; le pansement est sec.

Deuxième pansement : le trajet de la fistule est diminué de moitié.

Cinquième pansement : la tumeur, au niveau du cartilage, est devenue molle et petite ; le trajet de la fistule se referme ; pas de sécrétion.

Sixième pansement : ce dernier est sec; on le retire. Trois jours après, le cheval quitte l'hôpital.

OBSERVATION XIII. — « N° 33 ». Ancienne fistule du cartilage du sabot, suite de javart cutané. En traitement depuis deux mois, sans résultat.

Au niveau du cartilage du sabot intérieur, à la jambe postérieure gauche, tumeur à surface cornée, avec deux fistules qui communiquent. Sécrétion abondante de pus. Le tissu environnant est œdématisé, non douloureux; l'animal ne boite pas.

Premier pansement : pas de sécrétion, le pansement est sec; le tissu de la région affectée est élastique.

Deuxième pansement : une des fistules s'est fermée; les fistules ne communiquent plus.

Troisième pansement : le trajet se comble; pas d'œdème au niveau du cartilage.

Sixième et septième pansements : c'est à peine que l'on arrive à faire pénétrer un liquide dans la fistule.

Huitième pansement : le trajet est fermé. Deux jours après, le cheval quitte l'hôpital.

OBSERVATION XIV. — « N° 8 ». Ancienne fistule du cartilage du sabot à la jambe postérieure gauche, suite de javart cutané.

Au niveau du cartilage intérieur du sabot, on constate une tumeur indurée et indolore; près de la fourchette, on voit l'orifice d'un trajet fistuleux, s'étendant parallèlement à la couronne, sur une longueur de 6 centimètres et s'ouvrant au dehors. L'orifice antérieur laisse sortir un peu de pus grisâtre. Le trajet fistuleux pénètre dans la profondeur du cartilage du sabot.

Premier pansement : celui-ci est sec; lors du lavage du trajet au filtrat-vaccin, ce dernier sort par l'autre orifice.

Quatrième pansement : la tumeur du cartilage est notablement diminuée; le trajet fistuleux est rétréci; la sonde y pénètre à peine; les orifices ne communiquent plus; la sécrétion est insignifiante.

Sixième pansement : les trajets se sont fermés; les compresses sont sèches.

Septième pansement : il est tout à fait sec. Deux jours après, l'animal quitte l'hôpital.



OBSERVATION XV. — « N° 114 ». Crevasses gangreneuses compliquées, malgré le traitement médicamenteux, d'une fistule profonde du cartilage extérieur du sabot.

Il avait été appliqué au cheval des pansements au sublimé, à l'iode, à l'éther, à l'eau oxygénée, à l'huile phéniquée, à l'alcool camphré, à la glycérine iodée, à l'iodoforme, à la naphthaline. La cicatrisation s'effectuait avec une lenteur extrême ; il y eut des récidives ; la fistule tantôt s'ouvrait tantôt se refermait ; la sécrétion a été toujours abondante.

Premier pansement : on est frappé de la sécheresse de la compresse ; le tampon que l'on retire de la fistule est également sec. En pressant fortement, on fait sortir une goutte de pus blanchâtre.

Deuxième pansement : sécrétion abondante. La compresse et le tampon sont humides. La tension des tissus environnants est notablement diminuée.

Cinquième pansement : presque pas de sécrétion ; le trajet est encore assez large.

Septième pansement : il est tout à fait sec.

Onzième pansement : le trajet est fermé. On supprime les pansements. On tamponne seulement tous les jours la fistule au filtrat-vaccin.

Trois jours après : tout est sec. On ouvre l'orifice fistuleux au moyen d'une sonde ; celle-ci pénètre à 4 centimètres de profondeur ; la mèche introduite dans le trajet est sèche, seulement un peu teinte de sang. Le tissu environnant est mou, au palper. On applique un pansement.

Le lendemain : pas de sécrétion. La fistule est fermée. Ni œdème, ni tension, ni douleur. Le cartilage du sabot se dessine déjà nettement. Deux jours après, le cheval quitte l'hôpital.

En terminant nous voudrions signaler, à titre d'indication seulement, le résultat de vaccinothérapie dans un cas grave d'anasarque et dans plusieurs cas de gourme.

Le rôle étiologique du streptocoque dans l'anasarque, affirmé par plusieurs auteurs, ressort surtout des résultats cliniques favorables observés par de nombreux auteurs à la suite de la sérothérapie antistreptococcique (Lignières, Moulleron et Rossignol, Peuch, Pécus, Maier, Payrou et Verlinde).

Sans vouloir tirer de conclusion d'un cas unique, nous estimons utile de rapporter ici l'observation d'un cheval, chez lequel le pronostic a été particulièrement grave.

« Jane » ; tombe malade le 23 octobre. Température élevée jusqu'au 29 octobre.

29 octobre : Etat général très déprimé. Refuse la nourriture. Extrémités œdématisées. Pétéchies multiples au niveau de la muqueuse nasale. Les autres muqueuses, à l'exception de la cavité buccale, sont d'un rouge violacé ; écoulement de liquide rouillé des cavités nasales. Température 40°2 ; pouls 66 ; respirations 24. *Injection de 60 cent. cubes de filtrat-bouillon-vaccin dans les veines.* Le soir température 38°5 ; deux heures après : 37°8. Pouls 44 ; respirations 14. Les muqueuses sont devenues pâles ; les pétéchies ont dis-

paru. Le cheval a bonne mine; il a mangé toute sa ration d'avoine. L'œdème persiste.

30 octobre : Température 38°9; pouls 52; respirations 16. Œdème considérable du poitrail. Etat général bon; mange du foin. *Injection de 60 cent. cubes de filtrat-bouillon-vaccin dans les veines.* Le soir température 40°4; pouls 60; respiration 26; l'animal est triste, mange peu.

31 octobre : Le matin, température 39°1; le soir 39°9. L'état général a empiré. L'œdème est plus accusé. Réapparition de pétéchies sur les muqueuses. Présence de pétéchies même dans la cavité buccale. Mange du foin et de l'avoine.

1<sup>er</sup> novembre : Le matin, température 40°9; pouls 62; respirations 22. Inappétence. Les mouvements sont gênés par l'œdème. L'animal ne se couche pas. L'œdème du poitrail est diminué. *Injection de 100 cent. cubes de filtrat-bouillon-vaccin dans les veines.* Le soir, température 39°8; pouls 52; respirations 18.

2 novembre : Le matin, température 39°; pouls 54; respiration 24. L'animal a beaucoup meilleure mine; il a mangé toute sa ration d'avoine et de foin. Les muqueuses ont pâli; toutes les pétéchies, à l'exception de celles de la cavité buccale, ont disparu.

Le soir, température 37°8; pouls 42; respirations 16. Apparition d'une toux grasse.

3, 4, 5 novembre : Etat général excellent; mange de l'avoine et du foin. Température normale.

6 novembre : La température monte à 39°8; apparition de quelques pétéchies sur la muqueuse nasale.

Du 7 au 10 novembre : la température est normale.

11 novembre : La température monte de nouveau à 39°3; apparition de quelques pétéchies qui disparaissent au bout de trois jours. L'œdème disparaît peu à peu. Vers le 15 novembre on voit se dessiner nettement les tendons aux extrémités. Trois jours après, l'animal quitte l'hôpital guéri.

Nos observations relatives à la vaccinothérapie de la *gourme*, au moyen du filtrat-bouillon-vaccin antigourmeux, sont encore peu nombreuses.

Dans plusieurs cas traités au début de la maladie, nous avons observé un arrêt brusque du processus, sans suppuration. Nous ne saurions cependant attribuer l'évolution rapide de la maladie à l'action du vaccin, étant donné que l'on connaît des cas abortifs de *gourme*. Dans un cas cependant, le lendemain de l'injection intraveineuse de filtrat, la température, qui jusque-là était élevée, descendit à la normale; les ganglions sous-maxillaires, jusque-là légèrement tuméfiés, s'ouvrirent et donnèrent issue à un liquide spumeux sans pus.

Dans une série de cas où le traitement de la *gourme* a été institué en pleine évolution de la maladie, nous avons observé, à la suite de l'injection du vaccin, un abaisse-

ment rapide — en quelques heures — de la température et une résorption complète — en l'espace de vingt-quatre heures — des œdèmes inflammatoires étendus, au niveau des muscles masticateurs ou du pharynx. Ces résultats doivent être, à notre avis, sûrement attribués à l'action du filtrat. Dans la plupart des cas, les injections de ce dernier n'étaient accompagnées d'aucune réaction générale.

Malgré les bons résultats de ces premiers essais de vaccinothérapie dans la gourme, nous estimons que la valeur de ce traitement ne saurait être établie définitivement qu'après une expérience portant sur un grand nombre d'animaux. Cette expérience sera prochainement mise à exécution et fera l'objet de nos publications ultérieures.

#### CONCLUSIONS.

La vaccinothérapie, réalisée d'après la méthode de Besredka, nous a donné des résultats des plus favorables dans toutes les manifestations à staphylocoques et à streptocoques.

L'emploi des filtrats-bouillons-vaccins est tout indiqué chez les étalons atteints de crevasses gangreneuses.

Au début d'une épizootie, le stock-bouillon-vaccin peut être employé ; cependant l'auto-bouillon-vaccin, préparé avec les souches de streptocoques isolées au cours de l'épizootie, est préférable.

En l'absence de symptômes de nature septicémique, on pratiquera la vaccinothérapie locale, sous forme des pansements Besredka ; en présence des phénomènes généraux, on injectera du filtrat dans les veines (50 à 100 cent. cubes en une fois).

Les résultats obtenus jusqu'ici dans le traitement de la gourme au moyen de filtrats-bouillons-vaccins sont très favorables et justifient des essais sur une plus vaste échelle.



## RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LE CHARBON

par Cn. HRUSKA.

*(Institut sérothérapique vétérinaire, à Ivanovice,  
Tchéco-Slovaquie.)*

### DE L'IMMUNISATION ACTIVE CHEZ LE COBAYE.

Les recherches de Besredka ont démontré la possibilité de vacciner le cobaye contre le charbon par le procédé devenu aujourd'hui classique de cuti-vaccination. Nous nous sommes demandé si l'on pouvait obtenir l'immunité anticharbonneuse chez le cobaye, en le soumettant à la cuti-vaccination ou à la cuti-friction par des produits autres que des cultures de bactériidies du premier et du deuxième vaccin. Dans cet ordre d'idées, nous avons fait des expériences avec les produits suivants :

a) Culture charbonneuse en bouillon ayant séjourné quinze jours à l'étuve, puis débarrassée de bactériidies par filtration ;

b) Culture charbonneuse en bouillon, âgée de quinze jours, chauffée à 100°, pendant une heure ;

c) Extrait de rate charbonneuse des bovidés ayant succombé au charbon (Extrait dans l'eau physiologique, stérilisé par chauffage).

d) Extrait de rate et de foie des cobayes charbonneux (Extrait dans l'eau physiologique, stérilisé par chauffage) ;

e) Liquide d'œdème des cobayes et des lapins, morts de septicémie charbonneuse ; le liquide est centrifugé et chauffé à 96° pendant une heure ;

f) Liquide d'œdème des cobayes morts après l'injection de deuxième vaccin charbonneux ; le liquide est débarrassé du virus par addition de quelques gouttes de formol ou bien filtré sur bougie Chamberland après addition d'eau physiologique, (5 cent. cubes de liquide d'œdème pour 40 cent. cubes d'eau physiologique) ;

g) Liquide d'œdème des lapins morts à la suite de l'injection de deuxième vaccin ; le liquide a été débarrassé du virus comme plus haut.

Avec les produits indiqués, nous avons essayé de vacciner des cobayes, soit par friction de la peau, soit par injection dans la peau. L'opération était répétée deux fois, à sept jours d'intervalle. L'état d'immunité a été ensuite éprouvé au moyen du second vaccin charbonneux, par friction ou par injection sous-cutanée. Je ne puis rapporter *in extenso* le protocole de toutes ces expériences qui ont été très nombreuses ; je me contenterai de faire remarquer que dans les cinq premières séries (*a, b, c, d, e*), les expériences ont été complètement négatives, c'est-à-dire qu'en vaccinant la peau du cobaye avec les produits indiqués, nous n'avons pas pu obtenir d'immunité. Seuls se sont montrés immunisés les cobayes vaccinés par les produits employés dans les expériences *f* et *g*. Sukeyasu Okuda (1), collaborateur de Bail, a fait des expériences semblables chez les cobayes. Il a obtenu des résultats négatifs, mais c'est parce qu'il ne s'est pas conformé exactement au principe de Besredka relativement à la cuti-vaccination.

Voici, à titre d'illustration, l'histoire d'un cobaye qui a été cuti-vacciné, au moyen du liquide d'œdème provenant d'un cobaye inoculé avec le deuxième vaccin.

Cobaye n° 580 ; 470 grammes ; reçoit le 12 novembre 1924 2 cent. cubes de liquide d'œdème formolisé, en injection intradermique.

10 décembre, reçoit 2 cent. cubes de liquide d'œdème stérile, dilué dans de l'eau physiologique, puis filtré sur bougie, en injection intradermique.

14 décembre, inoculation de deuxième vaccin par friction (le témoin meurt le 18 décembre).

7 janvier, inoculation de virus charbonneux, par friction.

20 janvier, 1/4 cent. cube de deuxième vaccin *sous* la peau.

30 janvier, 1 cent. cube de deuxième vaccin *sous* la peau.

8 février, 0 c. c. 1 de virus pur *sous* la peau. Survit.

Voici l'histoire d'un autre cobaye, cuti-vacciné au moyen de liquide d'œdème du lapin, puis inoculé avec le deuxième vaccin.

(1) *Centralblatt f. Bakteriologie*, 90, nos 7-8.

Cobaye n° 573; 490 grammes; reçoit le 12 novembre 1924 2 cent. cubes de liquide d'œdème formolisé, dans le derme.

10 décembre, reçoit 2 cent. cubes de liquide d'œdème stérile, dilué dans l'eau physiologique et filtré, dans le derme.

14 décembre, inoculation de deuxième vaccin, en friction; le témoin meurt le 18 décembre.

7 janvier, inoculation de 1/4 de deuxième vaccin *sous* la peau.

30 janvier, 1 cent. cube de deuxième vaccin *sous* la peau.

8 février, 0 c. c. 1 de virus pur *sous* la peau. Survit.

Nous savons, depuis les recherches de Besredka, que l'immunité des cobayes cuti-vaccinés ne repose pas sur la présence dans le sérum des anticorps spécifiques. Nous avons voulu nous en rendre compte par nous-même. Un de nos cobayes cuti-vaccinés, ayant acquis vis-à-vis du virus une immunité très solide, fut saigné; son sang défibriné fut injecté à un cobaye neuf, à la dose de 5 cent. cubes, dans les veines. Inoculé sept jours après avec 1/4 de cent. cube de deuxième vaccin, il a succombé à l'infection par le deuxième vaccin, en même temps que le témoin. Le sang défibriné du cobaye cuti-vacciné ne possède donc pas de propriétés préventives. L'immunité du cobaye cuti-vacciné repose, par conséquent, comme le dit Besredka, sur la vaccination des cellules réceptives de la peau.

#### CONCLUSIONS.

1° En employant le procédé de Besredka, c'est-à-dire en cuti-vaccinant les cobayes au moyen du liquide d'œdème stérile, provenant des cobayes ou des lapins morts de charbon, on les vaccine contre l'infection charbonneuse; les résultats sont aussi bons que lorsqu'on cuti-vaccine des cobayes au moyen des cultures entières vivantes;

2° Le liquide d'œdème chauffé ne vaccine pas;

3° Le sang défibriné des animaux cuti-vaccinés, injecté dans les veines à un cobaye neuf, n'est pas capable de protéger contre l'infection charbonneuse;

4° Il se forme au sein de l'appareil cutané du cobaye et du lapin, infecté sous la peau avec des bactériidies, une substance capable de cuti-vacciner le cobaye contre l'infection charbonneuse.

# DE L'ANTIVIRUS GOURMEUX ET DE SON APPLICATION AU TRAITEMENT DES CHEVAUX ATTEINTS DE GOURME

par K. SVETKOFF et A. VELLER.

*(Laboratoire de bactériologie à l'Institut vétérinaire  
de microbiologie, à Leningrad,  
Directeur de l'Institut : Professeur B. L. Patzévitsh.)*

L'épizootie de gourme qui a éclaté au commencement de l'année courante (1926) nous suggéra l'idée d'essayer l'antivirus gourmeux. Pour préparer ce dernier, nous avons employé trente souches de streptocoques isolés dans les cas de gourme. Plusieurs d'entre eux ont été obtenus du pus d'abcès sous-maxillaires chez les chevaux gravement atteints; d'autres provenaient d'abcès des organes internes ou du sang du cœur des chevaux ayant succombé à la septicémie gourmeuse.

Plusieurs de ces streptocoques ont été contrôlés au point de vue de leur pouvoir hémolytique et de leur virulence; tous hémolysaient les globules rouges de mouton et se montraient pathogènes pour les souris blanches. Chacun des trente streptocoques futensemencé dans un ballon particulier, renfermant du bouillon préparé avec de la viande de cheval, additionné de 3 p. 100 de peptone (milieu recommandé par Gabritchovsky pour la culture du streptocoque gourmeux et la préparation du vaccin antigourmeux).

Les ballonsensemencés étaient portés à l'étuve. Dès le lendemain, les streptocoques donnaient une culture abondante tantôt sous forme d'un dépôt compact laissant le milieu limpide, tantôt sous forme d'un bouillon uniformément trouble avec ou sans dépôt. Après dix jours de séjour à l'étuve, le contenu de tous les ballons était réuni dans un seul récipient et filtré sur bougie Chamberland. Le filtrat ainsi obtenu était ensuite réparti en ampoules et employé, à titre curatif, chez les chevaux atteints de gourme.



Voici ce que nous avons observé en ce qui concerne les propriétés de ce filtrat *in vitro*. Des tubes à essai renfermant ce dernier ont été ensemencés avec des streptocoques gourmeux, avec des streptocoques isolés chez des chevaux atteints de maladies autres que la gourme, avec des streptocoques isolés chez des animaux autres que le cheval, enfin avec des bacilles du foin, des colibacilles, des staphylocoques, des bactériidies charbonneuses et autres.

Le lendemain, seuls les streptocoques gourmeux n'ont pas donné de culture ; les streptocoques non gourmeux se développaient dans le filtrat, faiblement il est vrai, mais d'une façon appréciable.

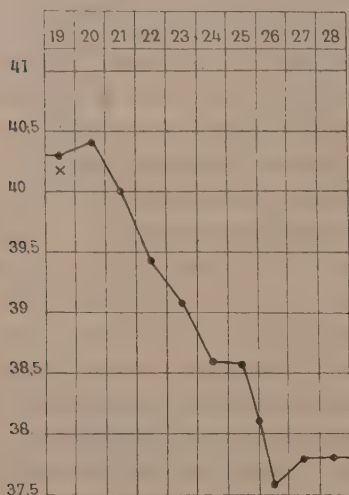


FIG. 1. — X. 100 cent. cubes d'antivirus en 4 points sous la peau de l'encolure. 23 janvier : la région pharyngée n'est plus douloureuse.

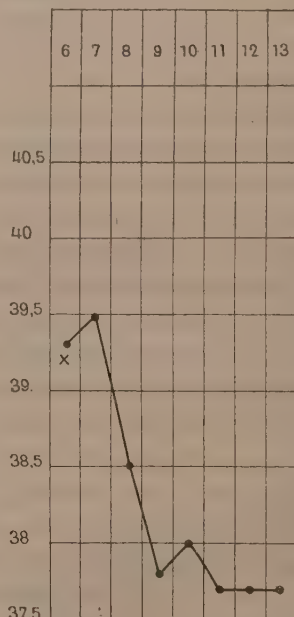


FIG. 2. — X. 75 cent. cubes antivirus en 3 points sous la peau de l'encolure. 11 février : les régions du pharynx et du larynx ne sont plus douloureuses.

ciable ; quant aux autres microbes, ils y poussaient d'une façon abondante.

Notre filtrat renfermait donc une substance qui s'opposait à la culture du streptocoque de la gourme, mais n'empêchait presque pas le développement des autres microbes.

L'effet de l'antivirus a été préalablement essayé sur deux

chevaux sains. A ceux-ci il a été introduit sous la peau de l'encolure, à chacun, 100 cent. cubes de filtrat, en un seul point. Après six-huit heures, on vit apparaître un œdème plat, douloureux, de dimensions de la paume de la main. Cet œdème a disparu le lendemain chez un des chevaux, le surlendemain chez l'autre. Il fut observé en même temps une réaction thermique : la température est montée à  $40^{\circ}$  chez l'un ; chez l'autre, à

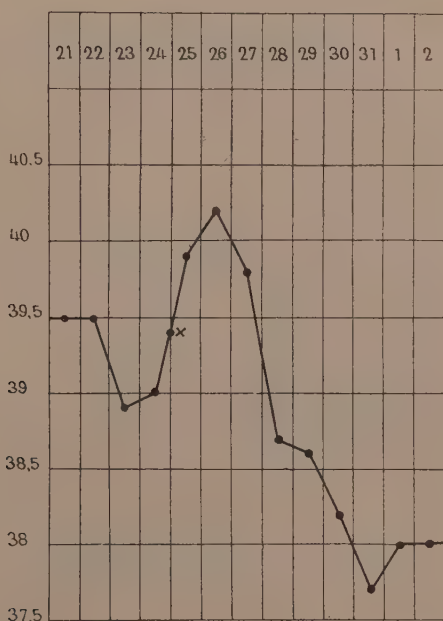


FIG. 3. — X 100 cent. cubes d'antivirus en 4 points sous la peau de l'encolure. 2 février : la douleur au niveau de la région laryngée est insignifiante.

$39,2^{\circ}$ . L'état général est resté bon. Le troisième jour, la température est revenue à la normale.

A deux autres chevaux, il a été injecté sous la peau, à titre de contrôle, 100 cent. cubes de bouillon ordinaire. Huit heures après, ils ont présenté de l'œdème et une élévation de la température de  $0^{\circ}5$ . Douze heures après, tout est rentré dans l'ordre.

Il résulte ainsi de ces deux expériences que notre filtrat

renfermait des produits de nature gourmeuse, susceptibles de déterminer chez les animaux une réaction certaine, mais qui était bénigne; c'est dire que l'antivirus, tout en étant spécifique, était inoffensif.

Nos essais de traitement avec de l'antivirus ont porté sur les chevaux du lazaret vétérinaire militaire de Leningrad. La dose employée a été de 100 cent. cubes; elle variait quelquefois de

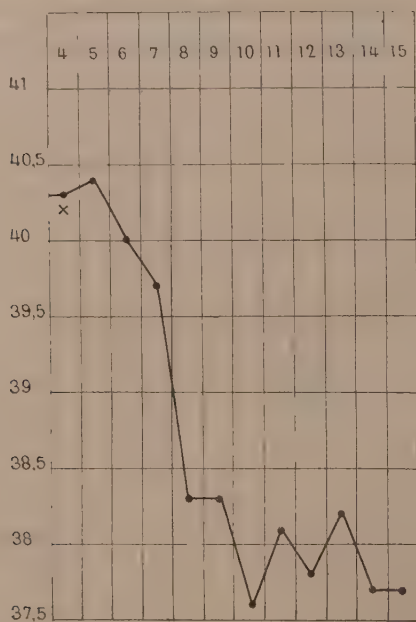


FIG. 4. — X. 100 cent. cubes d'antivirus en 7 points sous la peau de l'encolure. 8 février : l'écoulement est insignifiant. La région rétro-laryngée est peu sensible. 13 février : pas d'écoulement. Disparition de la douleur.

50 à 125 cent. cubes. L'antivirus était injecté sous la peau de l'encolure, en deux ou quatre points différents. Dans certains cas, l'antivirus a été injecté sous la peau de la région sous-maxillaire, au niveau même de la lésion.

Nous en avons employé, chaque fois que l'occasion se présentait, pour lavage et tamponnement des abcès des glandes sous-maxillaires et des poches gutturales.

Chez presque tous les chevaux, nous avons observé, à la

suite de l'injection d'antivirus sous la peau, une réaction locale et thermique, plus ou moins accusée, mais de courte durée. La réaction locale se traduisait par un œdème diffus, chaud, douloureux, apparaissant au niveau de l'injection; cet œdème qui était, d'ordinaire, de dimensions de la paume de la main, envahissait parfois toute la moitié inférieure du cou. L'œdème disparaissait au bout de trois-cinq jours. Chez quelques che-

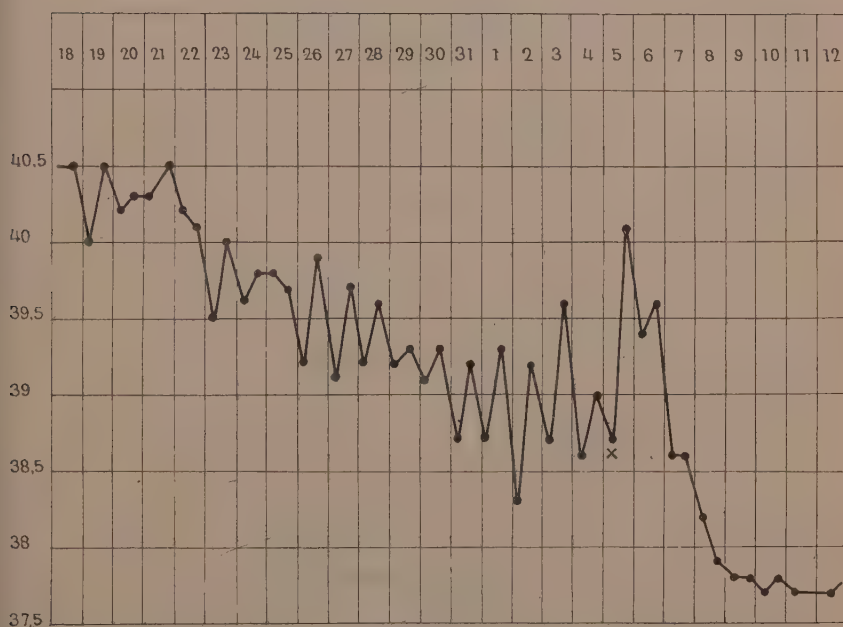


FIG. 5. — X. 100 cent. cubes d'antivirus en 4 points, sous la peau de l'encolure. 9 février : la salivation a cessé. 12 février : disparition de la douleur au niveau du pharynx et du larynx.

vaux, la température montait de  $0^{\circ}1$ ; chez d'autres, de  $0^{\circ}5$ ; elle revenait à la normale au bout de deux-six jours.

Avant de passer à l'examen des résultats obtenus, notons que la gourme de cette année a été particulièrement grave, tant au point de vue de son évolution que de ses complications; la mortalité a été élevée. Pour nous faire une idée de l'action exercée par l'antivirus, nous en employons en pleine évolution de l'infection, au moment où une guérison par le traitement



habituel ne saurait être escomptée. Il a été traité en tout 16 cas de gourme, avec ou sans complications.

Chez 5 chevaux, l'antivirus a été employé au premier stade de l'infection; il y eut seulement des troubles laryngés, accompagnés d'une forte fièvre. Chez tous les 5, aussitôt après l'injection de l'antivirus, on put observer une légère élévation

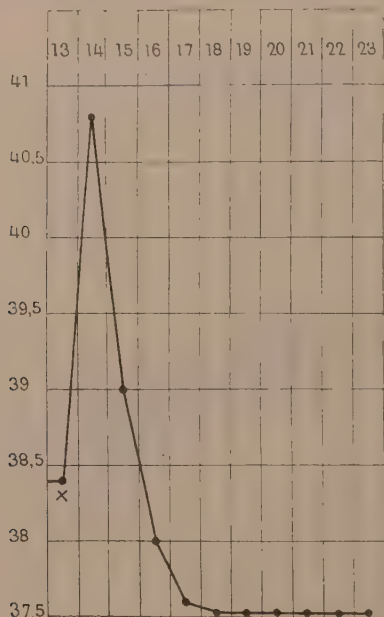


FIG. 6. — X. 100 cent. cubes d'antivirus sous la peau de la région sous-maxillaire. 14 janvier : au niveau de l'injection, tuméfaction de dimensions d'un poing. 18 janvier : du côté gauche, la tuméfaction a disparu. Pharynx et larynx ne sont plus sensibles. 23 janvier : la tuméfaction des glandes s'est résorbée sans suppuration.

de la température, suivie d'une chute rapide jusqu'à la normale et de disparition de tous les symptômes morbides. Nous ne constatâmes, dans la suite, aucune complication, pas même de suppuration des glandes sous-maxillaires (voir les observations n<sup>os</sup> 1, 2, 3, 4, 5).

Nous avons eu ensuite à traiter 2 chevaux avec des lésions siégeant au niveau des glandes sous-maxillaires. Chez l'un, la lésion se traduisait par une tuméfaction diffuse, douloureuse

de l'espace sous-maxillaire; après l'injection d'antivirus, la température monta d'abord pendant peu de temps, puis elle descendit rapidement à la normale : la tuméfaction des glandes sous-maxillaires se résorba sans qu'il y eût suppuration (obs. n°6).

Chez l'autre, au moment de l'injection d'antivirus, on apercevait déjà, dans l'espace sous-maxillaire, de la fluctuation;

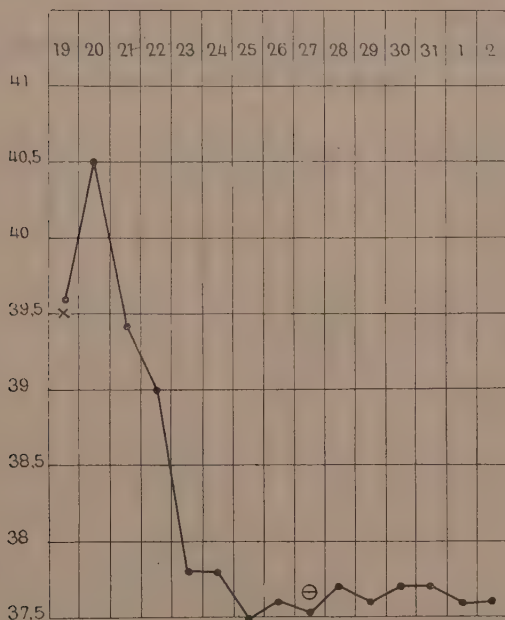


FIG. 7. — ×. 100 cent. cubes d'antivirus sous la peau de l'encolure en 4 points. 23 janvier : tuméfaction au niveau de la poche gutturale droite. 27 janvier : ⊖ Ouverture de l'abcès de la poche gutturale. Introduction de l'antivirus dans la cavité. 28 janvier : élimination insignifiante de débris de tissus venant de la cavité de l'abcès; pas de pus. 29 janvier : la tuméfaction autour de la plaie diminue; celle-ci se remplit de tissu de granulation; pas de pus.

l'abcès ayant été incisé le lendemain, on ne saurait se rendre compte de la part qui revenait à l'injection.

3 chevaux ont présenté une inflammation des poches gutturales. Chez l'un d'eux, à la suite de l'injection d'antivirus, les phénomènes inflammatoires ont disparu sans donner lieu à de la suppuration; chez les 2 autres, on constata une formation

rapide d'abcès; ceux-ci incisés, on n'observa aucune complication dans la suite.

Chez 2 chevaux, la gourme était compliquée d'une pneumonie catarrhale. Chez l'un d'eux (obs. n° 8), la température est rapidement descendue à la normale; les symptômes pulmonaires s'amendèrent progressivement, sans concours d'une médica-

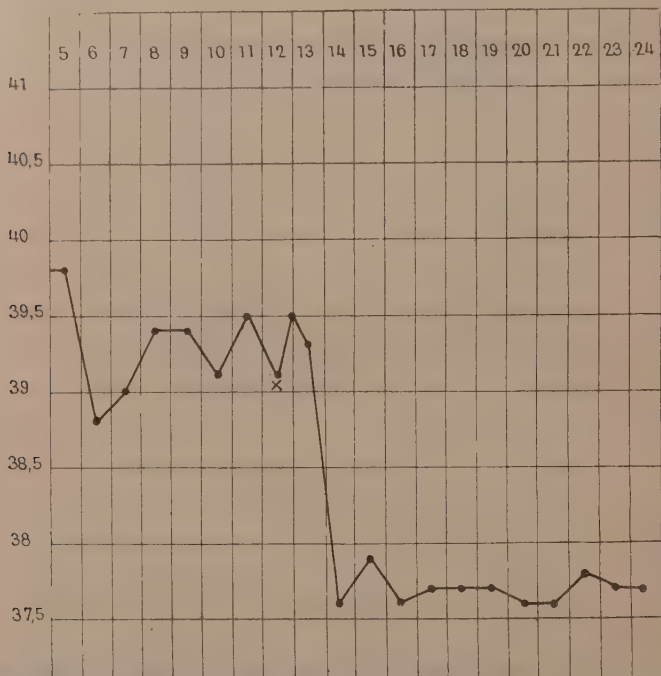


FIG. 8. — X. 100 cent. cubes d'antivirus en 2 points, sous la peau de l'encolure. 13 janvier : toux plus grasse. Dans les poumons, petits râles humides. 14 janvier : pharynx et larynx ne sont plus douloureux. 20 janvier : disparition des râles.

tion autre que l'antivirus; chez le second cheval (obs. n° 9), le résultat fut le même, mais il n'apparut qu'après six jours.

Un cheval a eu la gourme compliquée de pleurésie. L'antivirus a été employé deux fois, à huit jours d'intervalle. Cet animal a guéri; comme il a été fait usage en même temps d'une médication symptomatique, il a été impossible de savoir quelle était la part de l'antivirus.

Il en fut de même dans un autre cas où il y eut en même temps une bronchite capillaire.

Dans un autre cas, très grave, la gourme a été compliquée d'un phlegmon érysipélateux de la tête; l'effet produit par l'antivirus fut en ce cas particulièrement favorable (obs. n° 10). Notons que, douze jours après l'injection d'antivirus, au moment où l'état général du cheval était déjà normal, il a été constaté un abcès limité au niveau de l'injection de l'antivirus; le pus de l'abcès renfermait le streptocoque de la gourme.

L'effet du traitement ne fut pas moins frappant chez un

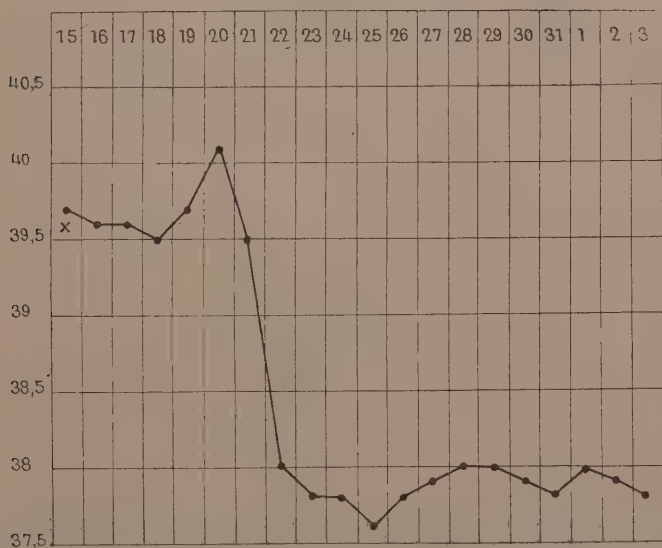


FIG. 9. — X. 100 cent. cubes d'antivirus sous la peau de l'encolure. 23 janvier : petits râles humides à l'inspiration. 24 janvier : râles humides dans la trachée. 26 janvier : disparition des râles de la trachée et des poumons. 29 janvier : larynx et pharynx ne sont plus douloureux.

autre cheval qui avait présenté, pendant huit jours, des oscillations thermiques, allant jusqu'à 40°3, en même temps que des phénomènes cliniques de nature septicémique, de la faiblesse cardiaque et une douleur dans la région laryngée (obs. n° 11). A la suite de l'injection d'antivirus, la température s'éleva de 0°9; elle descendit ensuite à la normale en l'espace de deux jours.



Les abcès, une fois ouverts, ont été traités par des lavages et des compresses à l'antivirus. A la suite de ce traitement, nous avons toujours constaté une diminution considérable de sécrétion de pus, suivie de formation de tissu de granulations remplissant la cavité des abcès.

En résumé, à l'exception de 2 cas où la gourme avait été

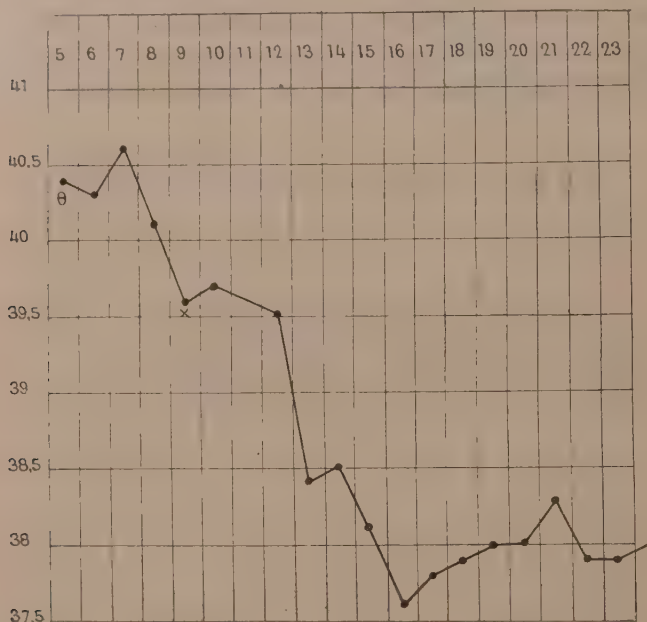


FIG. 10. — X. 125 cent. cubes d'antivirus sous la peau des deux côtés de la tête, au niveau de la tuméfaction. Application sur l'incision d'un tampon imbibé d'antivirus. 10 janvier: respiration moins gênée. La tuméfaction de la tête est augmentée. Pus sanieux. 11 janvier: tuméfaction stationnaire. Respiration normale. Sécrétion de pus diminuée. 12 janvier; état général meilleur. Appétit apparaît. Tuméfaction de la tête diminue. Pharynx et larynx ne sont plus douloureux. 15 janvier: la tête a pris l'aspect normal. La plaie se comble avec du tissu granuleux. 21 janvier: du côté droit, à l'angle de la bouche, une région fluctuante grosse comme une noix.

compliquée de pleurésie et de bronchite capillaire, et où par suite de l'emploi de médicaments, il nous fut difficile de juger de la part qui revenait à l'antivirus, chez tous nos chevaux, ce dernier a donné des résultats positifs très nets.

On pouvait se demander si, chez nos chevaux gourmeux,

l'effet curatif obtenu n'était pas dû à l'injection de bouillon seul, indépendamment de l'antivirus qu'il contenait. Pour

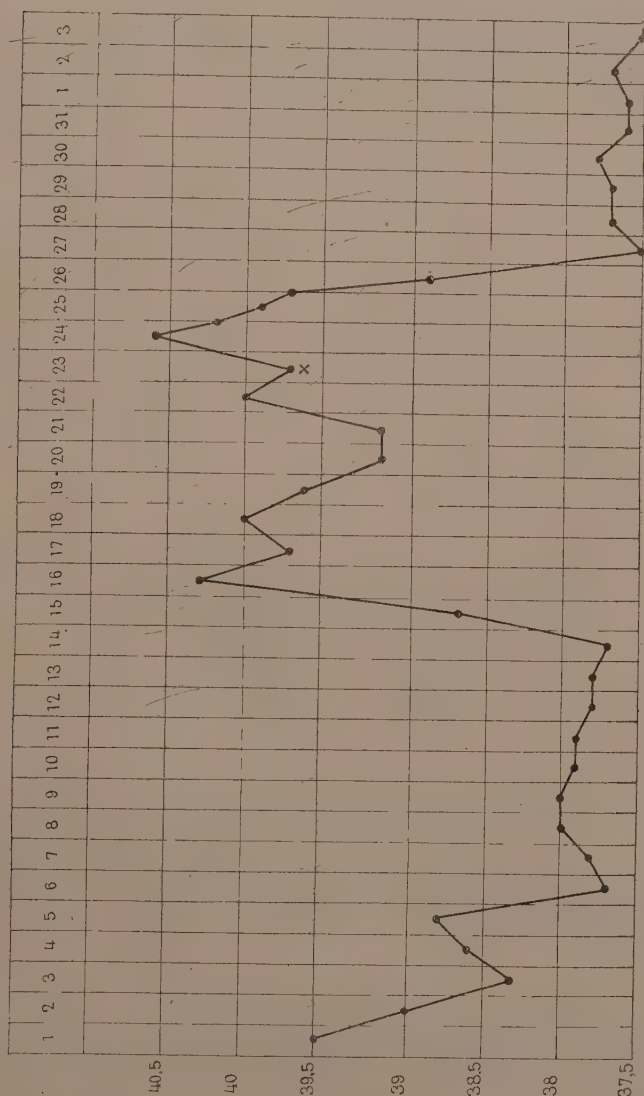


Fig. 11. — X. 100 cent. cubes d'antivirus sous la peau de l'encolure en 4 points. 24 janvier : état général mauvais ; refus de la nourriture. A la pression sur le rein ne réagit pas. 28 janvier : état général meilleur. Pouls plein. Diminution de la douleur au niveau du pharynx et du larynx. 28 janvier : Appétit normal. Sensibilité normale. Pharynx et larynx légèrement sensibles.

mettre la question au clair, à 2 chevaux atteints de gourme, il a été injecté 100 cent. cubes du bouillon qui a servi à la pré-

paration de l'antivirus. Comme il résulte de nos observations (n<sup>os</sup> 12 et 13), le bouillon seul n'exerça aucune action sur la marche de l'affection.

En terminant, nous voulons citer un cas où les phénomènes cliniques étant peu précis, on crut se trouver en présence d'un cheval gourmeux. A la suite de l'injection d'antivirus, on vit les symptômes s'aggraver d'une façon très nette; deux jours

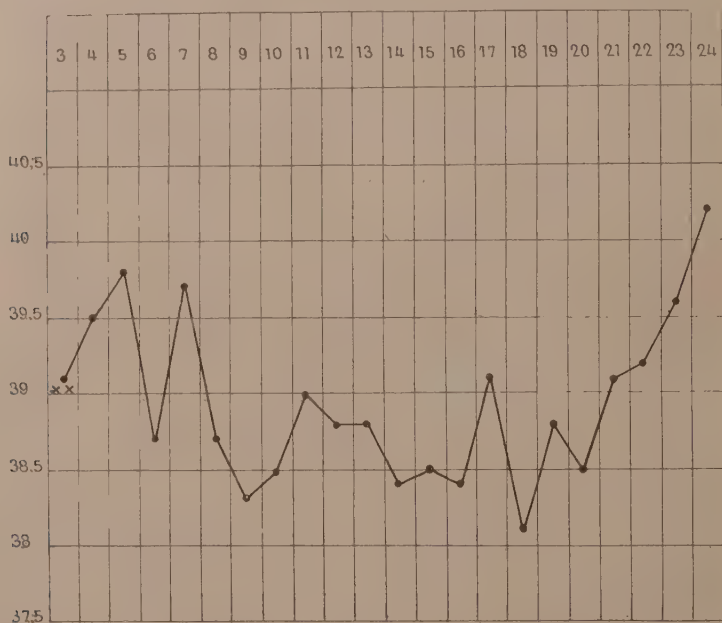


FIG. 12. — X. 100 cent. cubes de bouillon de deux côtés, sous la peau de l'encolure. 2 février : râle dans les poumons. 15 février : douleur accusée du pharynx; râles dans la trachée. 24 février : toux pénible. La percussion des poumons est douloureuse; matité en différents points. A l'auscultation : respiration affaiblie, râles humides.

après, l'animal est mort. L'autopsie montra que le diagnostic avait été erroné; il ne fut trouvé, chez cet animal, aucune lésion anatomique pouvant faire supposer la nature gourmeuse de l'affection.

En nous appuyant sur nos observations, peu nombreuses, il est vrai, nous pouvons formuler les conclusions suivantes :

L'antivirus gourmeux, employé par la voie sous-cutanée,

exerce une action curative chez les chevaux atteints de gourme ; cette action se manifeste par une résolution rapide du processus morbide et une cessation de l'état fébrile.

Il est à souhaiter que l'antivirus gourmeux puisse être essayé chez des chevaux sains, à titre prophylactique.

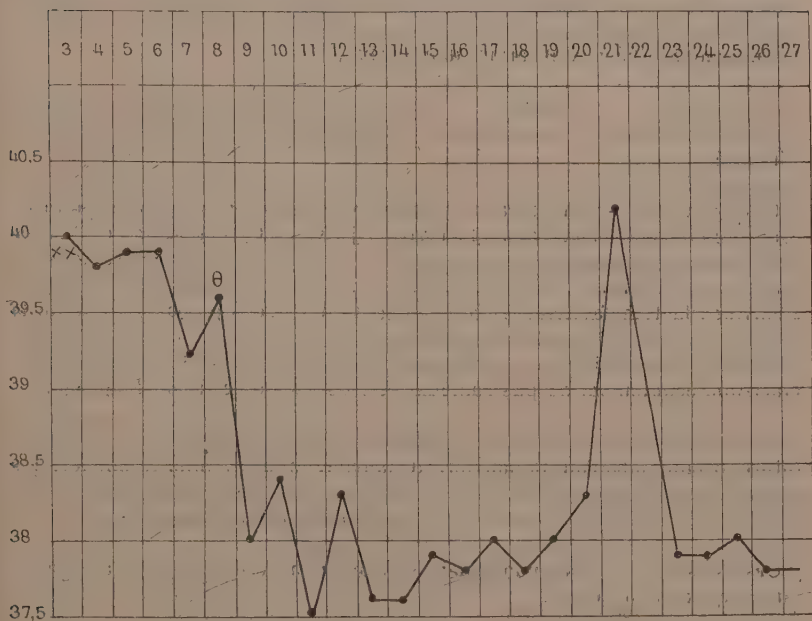


Fig. 13. — XX. 100 cent. cubes de bouillon sous la peau de la région sous-maxillaire. Θ. Ouverture de l'abcès des glandes sous-maxillaires.

OBSERVATION 1. — « Aviation ». Sensibilité accusée de la région pharyngée.

OBSERVATION 2. — « Auteur ». La muqueuse nasale est hyperémisée. Écoulement par les naseaux. Endolorissement du larynx et du pharynx.

OBSERVATION 3. — « Birka 307 ». Douleur prononcée au pharynx et au larynx.

OBSERVATION 4. — « Omar ». Hyperémie des muqueuses. Sensibilité accusée du larynx et du pharynx. Écoulement abondant : salive écumeuse de la bouche et des naseaux. Les glandes parotides sont augmentées de volume et sensibles.

OBSERVATION 5. — « Birka 16 ». Douleur prononcée du pharynx et du larynx. La déglutition est pénible. Liquide spumeux sortant en abondance de la bouche et des naseaux.



OBSERVATION 6. — « Avocat ». Ecoulement nasal. Tuméfaction des glandes sous-maxillaires, grosse comme un œuf de poule. Pharynx et larynx douloureux.

OBSERVATION 7. — « Birca 317. » Douleur accusée au niveau du larynx.

OBSERVATION 8. — « Nal ». Etat de dépression générale. Ecoulement nasal abondant. Douleur au niveau du larynx et du pharynx. Traitement : inhalation de vapeurs de térébenthine. 8 janvier, petits râles dans les poumons. Traitement : ammoniac. 11 janvier, toux sèche et douloureuse. Râles dans les poumons. Pharynx et larynx douloureux,

OBSERVATION 9. — « Anglais ». Ecoulement nasal abondant. Pharynx et larynx douloureux. A l'auscultation des poumons : respiration vésiculaire renforcée.

OBSERVATION 10. — « Autocrate ». Etat déprimé. Pharynx et larynx douloureux. Ecoulement nasal muco-purulent. 5 janvier : Ø) Ouverture de l'abcès des glandes sous-maxillaires. 6 janvier : tuméfaction diffuse des régions du pharynx et du larynx. 7 février : autour de l'incision, tuméfaction des tissus. 8 janvier : la tuméfaction a gagné la région des joues jusqu'à l'angle de la bouche. 9 janvier : la tuméfaction a augmenté des deux côtés de la tête. La déglutition est pénible. La respiration est gênée. Pouls 52. Au niveau de l'incision, écoulement de pus sanieux mêlé de débris de tissu désagrégé.

OBSERVATION 11. — « Birka 300 ». Pharynx et larynx douloureux. La température oscille jusqu'au 15 janvier. 16 janvier, pouls faible. 19 janvier, les bruits du cœur sont affaiblis. Région laryngée est très douloureuse. Alcool camphré et digitaline. 22 janvier, état général déprimé ; inappétence.

OBSERVATION 12. — « Neoudatchnaia ». Ecoulement nasal ; douleur au niveau du pharynx et du larynx.

OBSERVATION 13. — La muqueuse nasale est hyperémiée. La tuméfaction des glandes sous-maxillaires est de dimension d'un œuf de poule. Douleur au niveau du pharynx et du larynx.

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA VACCINATION ANTICHOLÉRIQUE PAR VOIE BUCCALE

par le prof. L. M. HOROWITZ-WLASSOWA  
et le Dr E. A. PIROJNİKOWA.

*(Laboratoire d'hygiène  
de l'Institut bactériologique à Ekaterinoslaw, Russie.)*

On connaît les difficultés qui surgissent dès qu'il s'agit de contrôler l'effet des méthodes de vaccination contre le choléra. Ces difficultés sont dues à l'impossibilité de reproduire, chez les animaux de laboratoire, le choléra intestinal tel qu'il se présente chez l'homme. C'est Metchnikoff qui, le premier, a nettement vu la différence qui sépare le choléra expérimental du cobaye du choléra intestinal de l'homme. Aussi dut-il s'adresser, pour l'étude expérimentale de cette dernière maladie, aux lapins nouveau-nés qui sont, disons-le en passant, d'un maniement assez difficile. L'impossibilité dans laquelle on se trouve pour contrôler expérimentalement l'effet des vaccins obligeait à avoir recours à la méthode empirique, c'est-à-dire aux statistiques; celles-ci, dont les points faibles sont bien connus, ne prêtent que trop le flanc à la critique.

Nous nous sommes attachés à reproduire le choléra intestinal chez le cobaye avec l'idée de pouvoir vérifier, dans le cas de résultats positifs, la valeur de la vaccination par voie buccale.

N'ayant à notre disposition qu'une race de vibron cholérique de virulence extrêmement faible (une culture entière ne suffisait pas pour tuer le cobaye par la voie intrapéritonéale), nous eûmes recours, pour l'exalter, au procédé que nous avons appliqué autrefois avec succès (1), c'est-à-dire à l'action concomitante de la sarcine jaune. Effectivement, après deux passages, notre culture fut à même de déterminer la mort du cobaye à la dose de 1/2 de culture.

(1) *Centralbl. f. Bakter.*, 58, 1911.

Pour réaliser l'infection *per os* avec cette culture, nous eûmes recours au procédé de la « sensibilisation » de l'intestin par la bile, proposé par Besredka.

Voici une de ces expériences.

*Cobaye n° 4*, du poids de 400 grammes, reçoit, par une sonde stomacale, 2 cent. cubes de bile de bœuf et, une demi-heure plus tard, une culture entière de vibrions cholériques (deuxième passage) sur gélose, âgée de vingt-quatre heures. Le cobaye meurt dans la nuit. A l'autopsie, son intestin grêle est fortement hyperémié et distendu; le contenu intestinal est liquide, légèrement muqueux et sanguinolent. La cavité péritonéale renferme de l'exsudat séreux; son feuillet pariétal accuse une hyperémie notable. La rate est augmentée de volume. Lesensemencements de l'exsudat péritonéal et du sang du cœur restent stériles; l'ensemencement du contenu intestinal donne de nombreuses colonies parmi lesquelles nous ne réussissons pas à discerner celles de vibrions cholériques. Faisons remarquer toutefois que, dans les autres expériences de la même série, les vibrions étaient assez nombreux sur des boîtes de Petri, ensemencées avec le contenu intestinal. *Quant au contenu de la vésicule biliaire, il contenait le vibron cholérique en culture pure.*

Ainsi, le procédé de Besredka nous a permis de reproduire chez le cobaye le choléra intestinal typique, de même qu'il a permis à Besredka lui-même de rendre le lapin sensible à l'ingestion de bacilles paratyphiques.

Cela établi, nous avons procédé aux essais de vaccination *per os*. En qualité de vaccin, nous avons choisi celui que nous avons étudié en 1912 (1), notamment, l'autolysat des vibrions cholériques dans du bouillon glucosé. Au bout de trois jours, la culture cholérique subit généralement une autostérilisation complète; elle semble être, selon nos expériences, bien appropriée à l'immunisation: l'autolysat en question favorise la production des anticorps non seulement antimicrobiens, mais encore anti-endotoxiques.

Voici la description de l'une de ces expériences.

*Cobaye n° 7*, du poids de 533 grammes, reçoit le 30 octobre, par la sonde stomacale, 1 cent. cube de bile de bœuf et 1 cent. cube de notre vaccin. Les jours suivants, on ne note rien d'anormal. Le 2 novembre, seconde vaccination dans les mêmes conditions. Le 6 novembre, le cobaye reçoit *per os* 1 cent. cube de bile de bœuf et une dose mortelle de vibrions vivants, émulsionnées dans 2 cent. cubes de solution physiologique. L'animal reste vivant et bien portant (durée d'observation: dix jours); le cobaye témoin meurt au bout de douze heures; il présente, à l'autopsie, des signes anatomo-

(1) *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 19, fasc. 1, 1913.

pathologiques de choléra intestinal, décrits plus haut; on trouve des vibrions cholériques seulement dans l'intestin et dans la vésicule biliaire; il n'y a pas de phénomènes septicémiques.

Il ressort donc de cette expérience que la vaccination *per os* confère au cobaye l'immunité contre l'infection *per os*.

Est-il possible d'obtenir, au moyen de la vaccination *per os*, l'immunité générale? Nous avons soumis nos cobayes, ayant résisté à l'infection *per os*, à une nouvelle épreuve, notamment à l'inoculation d'une dose mortelle des vibrions cholériques dans la cavité péritonéale. Les résultats de ces expériences ont été fort variables. Nous pûmes observer, dans certains cas, l'immunité générale complète; — dans d'autres l'absence totale de l'immunité; — dans d'autres encore une immunité générale relative.

Ainsi, un de nos cobayes (n° 7) résista à l'injection intrapéritonéale d'une dose mortelle de vibrions sans présenter aucun trouble visible, tandis que le cobaye témoin succomba le lendemain avec les symptômes habituels de septicémie cholérique.

Par contre, un autre cobaye (n° 28) qui avait été vacciné *per os* trois fois, entre le 5 et le 13 novembre, reçut cinq jours plus tard une injection intrapéritonéale de vibrions vivants (dans cette expérience nous avons omis à dessein l'infection préalable *per os*, pour exclure l'action vaccinante de la culture vivante); il succomba dans les vingt-quatre heures avec les symptômes habituels de septicémie cholérique.

Dans certains cas, chez les cobayes vaccinés *per os*, puis soumis à l'infection intrapéritonéale, nous avons pu constater un certain ralentissement dans le cours de la maladie.

Dans d'autres cas, chez les cobayes vaccinés *per os*, le processus pathologique différait considérablement de ce qui s'observe d'ordinaire dans la septicémie cholérique.

En voici un exemple :

Cobaye n° 8, de 554 grammes, reçoit *per os*, le 2 novembre et le 5 novembre, 1 cent. cube de bile de bœuf et 1 cent. cube de notre vaccin. Le 9 novembre, il reçoit *per os* une dose mortelle de vibrions vivants avec 1 cent. cube de bile de bœuf. Il ne présente rien d'anormal, tandis que le cobaye témoin périt dans les vingt-quatre heures. Le 19 novembre, le même cobaye reçoit par la voie intrapéritonéale la dose mortelle de vibrions vivants (laquelle fait périr le cobaye témoin dans les vingt-quatre heures); il ne présente, dans les trois jours qui suivent, aucun trouble apparent. Il meurt pourtant



au bout de quatre jours. A l'autopsie, on assiste à un tableau assez particulier. Dans la cavité péritonéale, il n'y a rien à noter, sauf une augmentation de volume de la rate et une forte distension de la vésicule biliaire. L'ensemencement de la bile, du sang du cœur et du feuillet pariétal du péritoine reste stérile. Les deux poumons, par contre, nagent littéralement dans de l'exsudat pleural; l'ensemencement de ce liquide donne une culture pure de vibrions cholériques.

Nous voyons dans ce cas particulier une localisation *sui generis* qu'il est difficile à ne pas mettre en rapport causal avec l'immunisation préalable *per os*.

Ajoutons que les cobayes vaccinés *per os* succombent, lors de l'injection intrapéritonéale des vibrions *tués* par la chaleur, dans les mêmes conditions que les cobayes témoins.

Il résulte de ces faits qu'en immunisant les cobayes contre le choléra intestinal *per os*, on n'est nullement certain de leur conférer l'immunité contre l'infection cholérique générale, lorsque l'agent infectieux pénètre par une voie autre que par la voie buccale. Ajoutons que, au point de vue pratique, ce fait n'a que peu d'importance, vu que l'homme n'est vulnérable à l'égard du vibrion cholérique que par son appareil gastro-intestinal.

Pour ce qui est de la production des anticorps chez les animaux vaccinés *per os*, on sait que de nombreux auteurs (Metchnikoff, Besredka, Teissier, Masaki, Nedrigailoff, Wakulenko, Barykine et Patzewitch, Glouchow, Ssadow, Linnikowa et Beliaewa, Ssokolowa et Goremikina, etc.) ont pu constater, lors de l'administration des doses massives de vaccin, la production des agglutinines, des bactériolysines et des sensibilisatrices de Bordet-Gengou.

L'élaboration des anticorps par suite de la vaccination *per os* n'est donc pas discutable; ce qui est bien plus important, c'est de savoir si l'immunité réalisée par vaccination *per os* peut s'établir en l'absence des anticorps?

On sait que le rôle dominant attribué aux anticorps dans l'immunité est fortement discuté (Metchnikoff, Besredka; nous avons, nous-mêmes, observé l'immunité sans anticorps dans nos recherches récentes sur la tuberculose expérimentale des cobayes).

En examinant le sang de quatre de nos cobayes ayant acquis l'immunité anticholérique (après vaccination *per os*, suivie d'infection par la même voie), nous pûmes constater que le

sérum sanguin dilué au 1/10 était complètement dépourvu du pouvoir agglutinant vis-à-vis des vibrions cholériques, ainsi que du pouvoir bactériolytique; ce sérum ne précipitait pas les filtrats de notre vaccin; la réaction de la fixation de l'alexine, en présence de ce dernier, restait également négative. Ces faits prouvent, une fois de plus, que les anticorps ne sont pas indispensables à l'immunité.

Pour élucider le mécanisme de la destruction des vibrions dans l'intestin des cobayes vaccinés *per os*, nous nous sommes proposé de suivre le sort des vibrions dans la lumière et dans les parois de l'intestin; ces expériences, arrêtées momentanément par suite de la baisse rapide de virulence de notre race, seront reprises prochainement.

Quant au mécanisme de la destruction des vibrions dans la cavité péritonéale chez les cobayes vaccinés *per os*, dans les cas où ces cobayes résistent à l'épreuve intrapéritonéale, nous avons constaté, en prélevant l'exsudat péritonéal quinze, trente minutes et deux heures après l'infection, une phagocytose intense; cette dernière a été, comme dans les observations de Metalnikoff et Toumanoff (1), bien plus accentuée que dans la cavité péritonéale des cobayes témoins; la bactériolyse faisait en ce cas complètement défaut, ce qui concorde avec l'absence des anticorps, mentionnée ci-dessus, et plaide en faveur de l'immunité cellulaire.

Nous croyons pouvoir tirer de nos expériences les conclusions suivantes :

1° Il est possible de réaliser chez les cobayes le choléra intestinal, en favorisant l'infection *per os* à l'aide de la bile, suivant le procédé de Besredka.

2° Les cobayes, vaccinés *per os* au moyen de vibrions cholériques morts, deviennent réfractaires à l'infection mortelle par la même voie; on arrive quelquefois à leur conférer l'immunité générale, mais cette dernière est loin d'être constante.

3° Il est possible d'obtenir chez les cobayes l'immunité contre l'infection *per os*, en les vaccinant par cette même voie, sans qu'il y ait trace d'anticorps microbiens; l'immunité semble en ce cas d'essence purement cellulaire.

(1) Ces Annales, n° 11, 1925.

## LE TRICHOPHYTON EN GOUTTE PENDANTE

par M. A. WILENCZYK.

(Institut bactériologique de la Faculté de Médecine de Varsovie.)

Une classification des champignons ne saurait être rationnelle que si elle s'appuie sur des points fixes, c'est-à-dire sur des manifestations de la vie qui sont permanentes et immuables. Si nous étudions l'existence des champignons pathogènes, nous verrons que dans cette existence il n'y a rien de stable, que le processus capital de la vie — la reproduction — peut se manifester en diverses formes chez le même champignon, et cela suivant les conditions de son habitat. C'est ce qui explique que, jusqu'à présent, ces champignons ne possèdent pas de place déterminée dans le système botanique et appartiennent au groupe des *Fungi imperfecti*.

Dans les travaux relatifs aux champignons déterminant des infections du cuir chevelu, nous trouvons certaines opinions telles, par exemple, celles de Sabouraud, de Plaut, qui, basées sur des expériences, rangent le champignon pathogène dans le groupe des *Astomycètes*.

En 1899, Matruchot et Dassonville, les premiers, émirent l'hypothèse que, eu égard à ses propriétés morphologiques, le Trichophyton se rapproche beaucoup de la famille des Ctenomycètes et qu'il doit, dans le système botanique, prendre place dans le groupe *Gymnoascus*. En 1901, cette hypothèse fut confirmée par les expériences effectuées sur des animaux chez lesquels, après inoculation de l'*Eidamella spinosa*, on réussit à provoquer une affection rappelant fort le Trichophyton. Sabouraud, en 1900, avait publié dans la *Pratique dermatologique* qu'il a observé chez un Achorion, depuis longtemps habitué aux milieux artificiels, des productions qui indiquaient une ébauche de périthèce ou un périthèce en voie de régression. Bodin découvrit les mêmes corps dans l'Achorion gypseum, Plaut dans les micropores. Toutefois Plaut n'était pas parvenu

à constater ces corps dans tous les cas et il faisait dépendre leur apparition d'une alimentation insuffisante du mycélium. Krzysztalowicz est d'avis que, de ces modifications, on ne saurait tirer aucune conclusion certaine quant à la place de ces champignons dans la classification générale et qu'il convient d'attendre la confirmation de la formation de fruits mûrs.

Je voudrais rendre compte des expériences que j'ai faites moi-même sur les champignons dans le Laboratoire de bactériologie de la Faculté de Médecine de l'Université de Varsovie. Ces recherches, je les ai effectuées sur des champignons en goutte pendante sur le milieu liquide de Sabouraud. La goutte fécondée idéale est celle qui contient un germe tiré d'un cheveu ou du squame d'un malade. On transporte cette goutte sur des lamelles de verre que l'on place dans des boîtes de Pétri. Dans ces boîtes on met quelques gouttes d'eau, à l'effet d'obvier au dessèchement de la goutte pendante, et aussi pour que les champignons puissent se développer mieux dans l'humidité. La température la plus favorable à ce développement est celle du corps humain : 36°-37°. Si le germe provient d'un cheveu contaminé par le trichophyton, après dix-douze heures, il s'en détache un filament qui se compose le plus souvent de deux ou trois cellules.

Il arrive que le germe produise des filaments de deux à trois côtés, ce qui indiquerait que le germe contient deux à trois noyaux. De cette manière se produit une jeune culture mince, fine, poussant très rapidement en longueur et détachant de divers côtés des branches primaires et secondaires. Après deux ou trois jours, nous trouvons une culture très développée qui occupe tout le champ de vision. Si la goutte est petite, les branches à la périphérie sortent de ses limites, s'étendant sur la surface du verre. Dans une culture jeune, qui compte à peine un à deux jours, le germe est uniforme. Dans certaines cellules du mycélium, surtout dans les cellules terminales, apparaissent nettement des granules d'où, grâce à la réfraction, émanent des reflets lumineux et qui par là se distinguent du reste du protoplasme. Ces granules se joignent par endroits, et à leur place se produit une vésicule qui, après quelques heures, prend la forme d'un noyau. Ces noyaux peuvent se déplacer ; ils peuvent rejeter le mycélium et alors ils gisent libres sur le milieu de



conservation. Le noyau libre s'accroît et se transforme en un germe qui, dans des conditions favorables, peut produire un nouveau mycélium. Plus souvent cependant, le noyau, dans la cellule même du mycélium, détache de lui-même un frêle rameau, très court, ondulé et pénétrant dans l'intérieur du milieu de conservation. Dans ce rameau, après un certain temps, se forme à l'extrémité libre un noyau qui, à son tour, détache de lui-même un autre rameau court, produisant à son extrémité libre un noyau et ainsi de suite, tant qu'il ne se rencontre pas avec une cellule voisine du rameau, ou un autre mycelium, avec lequel il s'unit. Alors, de l'endroit de la fusion se détache un nouveau filament sain et bien développé. Parfois les noyaux, dans les cellules du mycélium, germent tout de suite en filament mieux développé. Tel est l'aspect du mycelium dans les quatre à cinq premiers jours.

Si les conditions ne sont pas favorables au développement du champignon, si la goutte est trop petite, la température trop basse, on peut promptement observer un changement dans le tableau qui précède. Sur les filaments, aussi bien principaux que latéraux, apparaissent des protubérances qui, en peu de temps, se transforment en chlamydospores, cellules deux à trois fois plus grandes que les germes ordinaires.

Dans certaines d'entre elles on découvre un ou deux noyaux sous forme de vésicule. Les chlamydospores se trouvent à l'extrémité ou au milieu du filament. Simultanément, le filament change de forme, ses cellules se raccourcissent, s'enflent : la distance entre les parois diminue et le filament ressemble à un collier de coraux. Si les conditions du développement ne s'améliorent pas, le filament se partage en fragments distincts (spores), ce qui, si souvent, se rencontre dans le cheveu. Si le développement de la culture est normal, dans des conditions favorables au champignon, les filaments sont disposés régulièrement, ont une forme cylindrique et leurs protubérances sont rares. Après quatre à cinq jours apparaît un fin réseau de filaments qui s'entre-croisent. C'est alors que commencent à se manifester les premiers indices de la reproduction du mycélium. Le filament principal, ou bien son rameau, se divise en deux filaments fourchus, plus minces que le filament mère, courts et à marche ondulée. Chacun de ces filaments se divise

à son tour, en deux ou trois rameaux et, de cette manière, se forment plusieurs générations de filaments. Plus ceux-ci sont jeunes, plus ils sont minces et courts; l'espace entre eux diminue toujours et il arrive un moment où les fils se croisent entre eux et, à leur place, se produit un nœud uniforme (fig. 1).

Le lendemain, nous voyons que les filaments dont le nœud s'est formé, sont divisés en plusieurs cellules qui s'arrondissent et restent accolées. Quelques-unes de ces cellules germent de

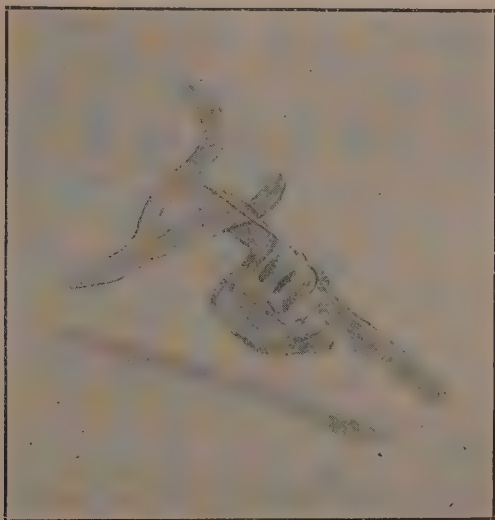


FIG. 1. — Nœud formé par des filaments.

Tous les dessins sont faits avec l'appareil à dessiner de C. Reichert.  
Grossissement ca. 700 fois.

nouveau en filaments qui, eux aussi, se croisent, se joignent et forment de nouveaux nœuds d'aspect encore plus vague, grâce au mycélium fortement développé (fig. 2). Dans la plupart des cas, ces agglomérations de cellules, formées à la place des nœuds, n'ont pas de périthèce, cependant, en cherchant soigneusement, on pourrait tout de même trouver des cellules chez lesquelles le périthèce existe, surtout dans les cas où deux rameaux, sortant du même filament, se réunissent par leurs extrémités en formant un anneau fermé. Chacun des rameaux contient un ou plusieurs noyaux qui, de ce filament, pénètrent

dans l'intérieur de l'anneau. Les noyaux se réunissent par groupes de deux, autour desquels se produit une bandelette de protoplasme, et c'est ainsi que se forme une cellule à deux noyaux. Dans certains périthèces, j'ai pu constater deux à trois cellules de ce genre. Il est difficile de dire ce que deviennent ensuite ces cellules, vu que le rapide développement du mycélium change l'image microscopique au point de la rendre méconnaissable. Dans certains endroits, on peut remarquer



FIG. 2. — Asque formé par un groupement de conidies.

qu'à la place des nœuds surgit un peloton mat, de couleur jaune foncé, qui reste dans le milieu de conservation et se trouve très faiblement rattaché à ce milieu.

Simultanément avec la formation des nœuds, dans une culture du trichophyton, nous pouvons observer la formation de conidies extérieures.

Aussi bien du filament principal que des filaments secondaires commencent à se détacher des filaments aériens, porteurs de conidies. A un faible grossissement, on a l'impression que le champ visuel tout entier est parsemé de taches noires. A un grossissement plus fort, on voit que le fil pousse un por-

teur de conidies qui à son tour rejette des rameaux en deux directions, parsemés de conidies de différente forme et de différente grandeur. Celles-ci se groupent séparément ou par deux des deux côtés des rameaux. Au commencement, les conidies n'ont qu'une cellule et sont rondes ou ovales. Ensuite, d'unicellulaires, les conidies se transforment en corps multicellulaires, et alors surgissent de grandes conidies, en forme de fuseau. Les conidies sont placées librement sur leurs porteurs et se trouvent à une distance considérable l'une de l'autre ; cependant, avec le temps, elles témoignent

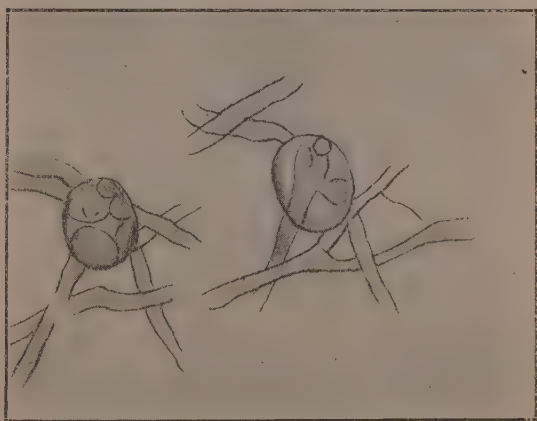


FIG. 3. — Asque formé sur une chlamydospore.

une tendance à se rassembler. Le porteur de conidies change sa direction droite en circulaire et de cette façon se produit une surface fermée vers laquelle gravitent les conidies se trouvant sur le porteur, ou bien sur les rameaux qui s'en détachent (fig. 4). Le lendemain, à la place de groupement de conidies, on voit des corps ronds qui rappellent les corps surgissant à la place des nœuds sur les filaments. Avec le temps, ces corps se colorent en jaune et, par places, ont une forme vague, semblable à un peloton de substance solide, placé sur la surface du mycélium et y adhérant très faiblement. Ces pelotons sont peu apparents parce qu'ils contiennent beaucoup d'air. Des corps semblables se montrent non seulement là où se trouvent



des agglomérations de conidies, mais aussi sur des conidies isolées, soit sur le filament principal lui-même, soit sur le filament secondaire, et alors il est aisé d'observer comment se forment ces corps. La cellule moyenne ou terminale du filament et les conidies se gonflent, prennent la forme d'une vésicule et au premier coup d'œil on a l'impression qu'à la place de la cellule se forme une vésicule d'air. Cependant, la teinte

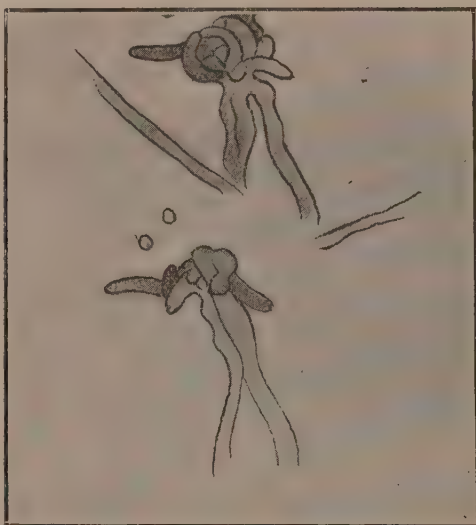


FIG. 4. — Les filaments dont le nœud s'est formé sont cloisonnés et divisés en plusieurs cellules.

jaune foncé de la vésicule, sa morphologie avec des périthèces nettement accusés, attestent que la vésicule n'est pas vide. Si nous ajoutons à la goutte un peu d'alcool et d'ammoniaque, le corps intérieur se dessine clairement sous la forme d'un corps ovale à double contour, séparé du reste du filament par une paroi et contient en outre un noyau (fig. 3). En résumé, il est à remarquer que dans le trichophyton on observe trois modes de reproduction :

1° Le croisement des fils mycéliens et la formation, là où il se produit, de corps ronds ou ovales dans la plupart des cas, de teinte jaunâtre. Souvent ces corps n'ont pas de forme déterminée et ressemblent à un peloton mat, jaune foncé, se trou-

vant à la surface du mycélium et faiblement adhérent à ce dernier;

2° La formation de conidies extérieures et le groupement de celles-ci. A la place de ces groupements apparaissent les mêmes corps qu'aux nœuds des filaments;

3° Le gonflement des conidies isolées ou des cellules du mycélium et leur transformation en corps ronds ou ovales contenant à l'intérieur un noyau (chlamydospores).

D'après mes observations, j'en viens à cette conclusion que les formes qui se montrent dans les trois modes décrits sont

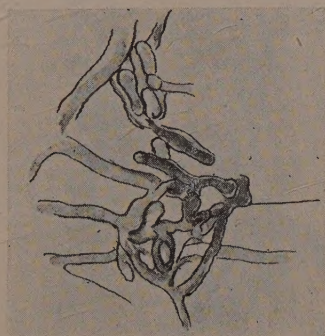


FIG. 5. — Les porteurs de conidies changent leur direction droite en circulaire et de cette façon se produit une surface fermée vers laquelle gravitent les conidies. Le nœud formé à la place de conidies.

les stades initiaux d'un développement d'asques et que, dans des conditions favorables, ces corps s'accroissent et produisent des fruits mûrs qu'on peut observer sur nombre de préparations et qui affectent l'aspect de petits sacs remplis de conidies. On dirait un petit panier rempli d'œufs (fig. 2, 3, 6, 7). Il est évident que, dans les cultures, il y a peu de fruits mûrs. Il faut les chercher longtemps. Ils ne mûrissent que dans des conditions spéciales qui nous sont inconnues. La condition essentielle pour le développement normal du champignon est la quantité du milieu de conservation. Le plus favorable est le milieu de Sabouraud. Toutefois, celui-ci ne saurait remplacer le milieu naturel. On peut supposer que les champignons pathogènes des cheveux, de même que les autres moisissures,

existent quelque part dans la nature, en un siège qui nous est inconnu. Édouard Eidam, exécutant des expériences sur les champignons de la famille *Ctenomyces*, affirme que, sur des milieux artificiels, il n'a jamais réussi à obtenir des asques mûrs, tandis que ceux-ci apparaissent en grande quantité sur le milieu naturel. Eidam, dans son travail sur *Fungi imper-*

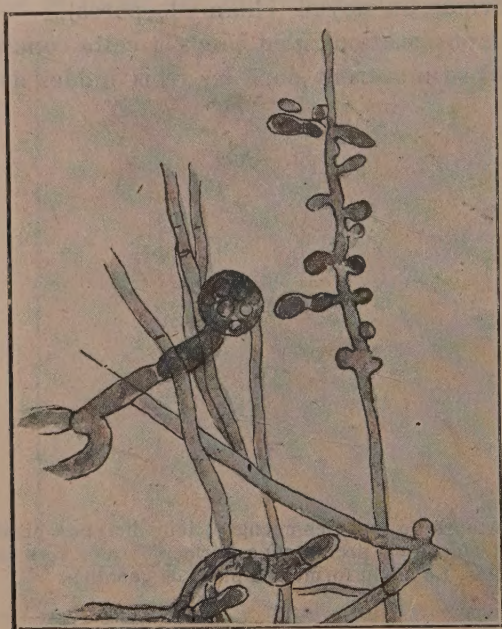


FIG. 6. — Asque formé à la place de cellule du mycélium.

*fecti*, fait remarquer que la maturité des asques n'est possible que sous l'action d'agents naturels. Les asques peuvent cependant apparaître parfois sur un milieu artificiel. On ignore quels sont les agents qui jouent ici un rôle. Je pourrais en indiquer un. J'ai obtenu des préparations avec des asques mûrs dans des gouttes où avait été semé un germe pris, non sur un cheveu, mais sur une vieille culture. Pour que la culture conservât sa force vitale et ses propriétés biologiques, toutes les trois semaines je la transportais sur un milieu frais de conservation de Sabouraud. De cette manière, j'ai obtenu plusieurs



génération (8-10) et de la dernière de celles-ci, j'ai isolé un germe dans une goutte pendante. Dix jours après se sont montrés dans cette goutte des asques mûrs. J'ai ainsi obtenu jusqu'à présent des asques sur plusieurs espèces de trichophytons (*Tr. cratériforme*, *plicatile*, *cérébriforme*).

Le mode de culture est un facteur non moins important dans le développement du champignon. Afin de procurer au

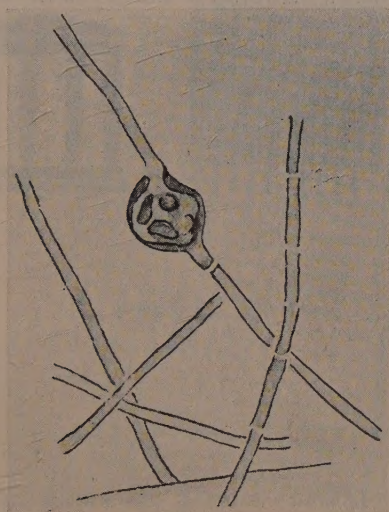


FIG. 7. — Asque formé à la place d'une chlamydospore.

champignon une quantité suffisante d'air, il est mieux de cultiver les germes sur des verres que l'on place dans des boîtes de Piétri. Cette méthode présente encore un autre avantage : elle permet de régler l'humidité. Au début, le développement du champignon demande une grande quantité d'eau : mais, plus tard, après dix-quinze jours, l'humidité fait obstacle à la maturation du fruit. J'ai remarqué que les périthèces, sur les nœuds de filaments, se forment dans les boîtes qui contiennent peu d'eau et que, par contre, les groupements de conidies forment des nœuds là où il y a beaucoup d'eau. C'est dans des préparations presque sèches que j'ai observé des asques mûrs. Tel est, dans ses grands traits, le développement du Tricho-



phyton. Il est plus que probable que ce champignon appartient au groupe des Ascomycètes.

Les expériences que j'exécute en ce moment en vue de distinguer les différentes formes du trichophyton ne font que me confirmer dans cette opinion.

Je me réserve d'en parler dans un autre travail.

(*Institut de bactériologie de l'Université de Varsovie, Faculté de Médecine. Pr. NITSCH, Hôpital « na Crystem » [Dr W. Sterling].*)

Le Gérant : G. MASSON.